

**Analyse und Funktionalität von  $\alpha\beta$ -T-Zellen im klinischen  
Kontext einer Patienten-individuellen anti-Tumor-Vakzinierung  
und der Graft-versus-Host-Disease**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Katja Kühn  
aus Dresden

Tübingen  
2020

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

Tag der mündlichen Qualifikation:

10.06.2020

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Karin Schilbach

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Stevanović

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	III
Zusammenfassung .....	V
Summary .....	VIII
Publikationsliste der kumulativen Dissertation .....	X
Anteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen .....	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.1.1 T-Lymphozyten vermittelte Immunreaktion .....	2
1.1.2 Aufbau des T-Zellrezeptors .....	3
1.1.3 Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I und II .....	5
1.1.4 T-Zellaktivierung .....	6
1.1.5 Zentrale und periphere Immuntoleranz .....	7
1.2 Tumorimmunologie.....	7
1.2.1 Immuntherapien .....	9
1.2.1.1 Immun-Checkpoint-Inhibitoren.....	9
1.2.1.2 CAR – T-Zellen Therapie.....	10
1.2.1.3 Anti-Tumor-Vakzine und Adjuvantien.....	11
1.2.1.4 Immunogener Zelltod (ICD) .....	13
1.3 Pankreaskarzinom und derzeitige Therapiemöglichkeiten .....	13
1.4 Graft-versus-Host-Disease .....	15
1.4.1 Akute Graft-versus-Host-Disease (aGvHD) .....	16
1.4.1.1 Pathophysiologie der aGvHD.....	16
1.4.2 chronische Graft-versus-Host-Disease (cGvHD).....	17
1.4.2.1 Pathophysiologie der cGvHD.....	17
2 Zielsetzung .....	19
3 Ergebnisse und Diskussion .....	21
3.1 Analyse und Funktionalität von $\alpha\beta$ -T-Zellen nach Patienten-individueller anti-Tumor-Vakzinierung .....	22
3.1.1 Bestimmung immunogener Impfpeptide und deren Wirkung auf die T-Zellen .....	22
3.1.2 Analyse der Impfstoff-reaktiven T-Zellpopulation nach Vakzinierung und <i>in vitro</i> Stimulation .....	23
3.1.3 T-Zellrepertoire der immunreaktiven T-Zellen nach Vakzinierung und nach <i>in vitro</i> Stimulation .....	24
3.1.4 Analyse der CDR3-Region immunreaktiver T-Zellen .....	25
3.1.5 Zelluläre und molekulare Charakterisierung Impfstoff-reaktiver T-Zellen .....	26

3.1.6 Wissenschaftlicher Standpunkt und Perspektive der Patienten-individuellen Vakzinierung .....	26
3.2 Analyse und Funktionalität von alloreaktiven $\alpha\beta$ -T-Zellen der cGvHD .....	29
3.2.1 Entstehung alloreaktiver T-Zellen nach T-Zell-depletierter HSCT in NSG-Mäusen .....	29
3.2.2 Analyse der cGvHD verursachenden T-Zellpopulation und deren phänotypische Auswirkung.....	31
3.2.3 T-Zellrepertoire der allogenen T-Zellen.....	32
3.2.4 Analyse der CDR3-Region allogener T-Zellen .....	32
3.2.5 Zelluläre und molekulare Charakterisierung allogener T-Zellen .....	33
3.2.6 Assoziation zwischen Patienten-individuellem MHC: Auftreten von Autoimmunerkrankung und GvHD .....	34
4 Fazit .....	35
5 Literaturverzeichnis.....	37
6 Danksagung.....	44
7 Anhang .....	45
 <i>Paper 1: Immune monitoring and TCR sequencing of CD4 T cells in a long term responsive patient with metastasized pancreatic ductal carcinoma treated with individualized, neoepitope-derived multipeptide vaccines: a case report</i>	
<i>Paper 2: Chronic graft-versus-host-disease in CD34(+)-humanized NSGmice is associated with human susceptibility HLA haplotypes for autoimmune disease</i>	

## Abkürzungsverzeichnis

AICD	<i>activation-induced cell death</i>
APC	<i>antigen presenting cell</i>
Arg	Arginin
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CMV	Cytomegalievirus
CRTAM	<i>cytotoxic and regulatory T cell molecule</i>
CTLA	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein</i>
cTEC	<i>cortical thymic epithelial cells</i>
DAMP	<i>damage-dissociated molecular pattern</i>
DC	<i>dendritic cells</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i>
GvL	<i>Graft-versus-Leukemia</i>
GvT	<i>Graft-versus-Tumor</i>
HASEH	<i>human autoimmunity susceptibility extended HLA-haplotypes</i>
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HSCT	<i>hematopoietic stem cell transplantation</i>
ICD	<i>immunogenic cell death</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
iTreg	<i>induced regulatory T cell</i>
KIF	Kinesin
Lys	Lysin
NGS	<i>next-generation sequencing</i>
NSG	<i>NOD scid gamma</i>
Met	Methionin
mDC	<i>myeloid dendritic cells</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
miHA	<i>minor histocompatibility antigen</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mTEC	<i>medullary Thymic epithelial cells</i>
nTreg	<i>natural regulatory T cell</i>
p.	Protein
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PDA	duktales Adenokarzinom des Pankreas
PD-L	<i>programmed cell death protein</i>
PSA	<i>prostate-specific antigen</i>
RMI	<i>RecQ-mediated genome instability protein-ligand</i>
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i>
TAA	<i>tumor associated antigen</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
TEMRA	<i>terminally differentiated effector memory CD45RA<sup>+</sup></i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor -<math>\beta</math></i>
T <sub>H</sub>	T-Helferzellen

TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>
TRAC	<i>T cell receptor alpha constant</i>
TRAJ	<i>T cell receptor alpha joining</i>
TRAV	<i>T cell receptor alpha variable</i>
TRBC	<i>T cell receptor beta constant</i>
TRBD	<i>T cell receptor beta diversity</i>
TRBJ	<i>T cell receptor beta joining</i>
TRBV	<i>T cell receptor beta variable</i>
TSA	<i>tumor specific antigen</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

## Zusammenfassung

Hämatologische Erkrankungen wie Leukämien sowie solide Tumore mit Metastasenbildung haben häufig eine schlechte Prognose. Standardisierte Therapien, wie Chemo – und Strahlentherapie, können initial Remissionen erzeugen sind aber häufig mit einem Rezidiv verbunden und in Folgetherapien weniger wirksam, da die Tumorzellen einen erworbenen Selektionsvorteil gegen diese Therapie entwickelt haben.

Die Immuntherapie wird immer wichtiger in der Tumorthherapie. Basierend auf der Physiologie der Immunzellen kann spezifisch mit dem eigenen Immunsystem oder nach hämatopoetischer Stammzellentransplantation (HSCT) mit allogenen Immunzellen der Tumor/ die Leukämie bekämpft werden.

Eine Form der Therapie ist die anti-Tumor-Vakzinierung. Aus Tumorgewebe werden die Mutationen mit *Next-Generation Sequencing* (NGS) identifiziert, entsprechende Impfpeptide designt und diese, analog zu den klassischen Impfungen, dem Patienten in Kombination mit einem Adjuvans appliziert und so die T-Zellen des Patienten gegen den eigenen Tumor gerichtet.

Eine weitere Form der Immuntherapie, besonders bei Leukämiepatienten angewandt, ist die HSCT. In Vorbereitung auf die Transplantation werden die Patienten aufgrund der maximalen Chemotherapie immundefizient, da die hoch konzentrierte Chemotherapeutika alle hämatopoetischen Zellen zerstört. Nach anschließender allogener HSCT bilden transplantierte Stammzellen, nach dem Anwachsen, der Differenzierung und Proliferation in dem Patienten, ein gesundes Immunsystem. Dieses reagiert im optimalen Fall gegen die Leukämiezellen. Beide Therapien, die HSCT sowie die Patienten-individuelle anti-Tumor-Vakzinierung nutzen das Potenzial aktivierter T-Zellen und können dem Patienten mit Krebs einen Überlebensvorteil ermöglichen.

Im Gegensatz zu den erwünschten T-Zellantworten sind aktivierte T-Zellen, die nach einer HSCT, das Gewebe und die Organe des Empfängers angreifen und eine Autoimmunerkrankung oder eine *graft-versus-host disease* (GvHD) induzieren unerwünscht. Therapien mit Kortison und Immunsuppressiva führen häufig zu lebensbedrohlichen Infektionen und reduzieren den Behandlungserfolg. Neue Therapiestrategien für Abstoßungsreaktionen fehlen und Forschungen bezüglich neuer Medikamente sind aufgrund fehlender Tiermodelle mit humaner chronischer GvHD schwierig.

Für den ersten Teil der Arbeit, die Analyse immunreaktiver T-Zellen nach individueller anti-Tumor-Vakzinierung untersuchten wir, bei einem, an Pankreaskarzinom erkrankten 62-jährigen Patienten, nach Resektion und Detektion zweier Missense - Mutationen in einer Lebermetastase, über Exomsequenzierung, ob die darauf abgestimmten vier synthetisierten Impfpptide mit Tumor-spezifischer Mutation, unter Berücksichtigung der MHC-Restriktion des Patienten, eine anti-tumorale T-Zellantwort induzieren konnten. Die Impfung erfolgte monatlich in einem Zeitraum von 5 Jahren. Die durch Impfpptide reaktivierten T-Zellen, isolierten und untersuchten wir an 3 verschiedenen Zeitpunkten, nach 12, 17 und 34 Impfungen und konnten eine erfolgreich etablierte anti-tumorale Impfpetid- und T-Zell-spezifische Immunantwort nachweisen. Basierend auf den molekular identifizierten CDR3-Regionen dieser T-Zellen konnten wir sowohl Persistenz und Breite der induzierten Immunantwort zeigen sowie durch konvergente CDR3-Regionen der TCRs Rückschlüsse auf die Immunogenität der Impfpetide schließen. Der Patient profitierte von der Vakzinierung, er zeigte keine Nebenwirkungen und lebte 6 Jahre ohne Rezidiv.

Im zweiten Teil der Arbeit, untersuchten wir 15 CD34<sup>+</sup> selektionierte / CD3<sup>+</sup> depletierte humane Stammzelltransplantate in NSG Mäusen auf ihr Potenzial eine Abstoßung zu induzieren. Wir konnten zeigen, dass transplantierte CD34<sup>+</sup> humane Stammzellen in den Mäusen anwachsen und in 2 der 15 Transplantaten ab der 24. Woche sich eine systemische, autoimmune cGvHD entwickelte, die in Lunge, Leber, Haut, Gingiva und Darm auftrat.

Die beiden Transplantate unterschieden sich von den Transplantaten der anderen 13 Spendern in den HLA-Merkmalen, das heißt beide GvHD induzierende Transplantate zeigten einen Haplotyp, der mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer GvHD oder Autoimmunerkrankung assoziiert ist. Beide Haplotypen werden definiert als HASEH engl.: *human autoimmunity susceptibility extended HLA-haplotypes*.

Die reaktiven T-Zellen, CD4<sup>+</sup> T<sub>H2</sub>-Zellen, mit autoreaktiven CDR3-Regionen, exprimieren in den betroffenen Geweben der erkrankten Mäuse, verstärkt die profibrotischen Zytokine IL-13 und IL-4 und verursachen sclerodermatöse Haut, eine fibrotische Lunge, verschiedene Hepatitis und massive Zahndeformationen bis hin zum Zahnverlust.

Die Besonderheit dieses CD34<sup>+</sup> NSG-Modells, weder Thymus oder Thymus-abgeleitete regulatorische T-Zellen (nTreg) noch B-Zellen konnten nachgewiesen



werden, was die Rolle des genetischen Polymorphismus und der Zytokine bezüglich der Pathogenese der cGvHD verdeutlicht.

Die Etablierung eines solchen Modells, das erstmals die chronische, autoimmune Variante der Abstoßungsreaktion in seiner multiorganen Pathologie induziert, eignet sich für Untersuchungen, die zur Aufklärung der Pathophysiologie humaner Autoimmunität und cGvHD beitragen und bietet die Möglichkeit, neue Behandlungsstrategien zu entwickeln und zu untersuchen.

## Summary

Hematologic malignancies like high-risk leukemia and solid tumors with advanced stage still have a poor prognosis. Initial response/ remission can be achieved by standard therapies such as chemotherapy and radiotherapy, but recurrence is often inevitable. After recurrence, subsequent therapies are less effective because the tumor cells have acquired a drug-resistant selection.

Recently immunotherapy is becoming increasingly important in anti-tumor therapy. Cancer cells can be attacked by the patient's own immune system or by allogeneic immune cells following hematopoietic stem cell transplantation (HSCT).

A representative example of currently explored immunotherapy is anti-tumor vaccination. The individual mutations of the tumor cells can be identified with next-generation sequencing (NGS). By using this technology, the corresponding target peptides can be designed and they can be applied to the patient in combination with an adjuvant to enhance T-cell response against tumor cells.

A representative example of established immunotherapy, especially for leukemia patients, is HSCT. In preparation for the transplant, the patient receives the maximum intensity of chemotherapy, which destroys the patient's hematopoiesis. After subsequent allogeneic HSCT, the patient experiences the reconstitution of a new immune system derived from the donor when donor's stem cells successfully engraft. In the optimum case, the new immune system reacts against patient-derived leukemia cells. Both of these therapies, i.e. HSCT and patient-specific anti-tumor vaccine, exploit the potential effector functions of T cells.

In contrast to these desirable T cell responses, activated T cells can also attack the normal tissue and induce autoimmune diseases or graft-versus-host disease (GvHD). Therapies against autoimmune reaction with cortisone and immunosuppressants often lead to life-threatening infections and disease relapse. Optimal therapeutic strategies to human chronic GvHD are not yet established due to the lack of suitable animal models to examine a new therapy.

The first part of this dissertation shows the analysis of immune-reactive T cells of a 62-year-old patient suffering from metastatic pancreatic cancer after individual anti-tumor vaccination. The vaccination was designed with the four synthesized peptides based on tumor-specific mutations, in consideration of the patient's MHC restriction. These missense mutations were detected via exome sequencing using a metastatic region in

liver. The vaccinations were carried out monthly over a period of 5 years. T cells responding to the vaccine were isolated and examined at 3 different time points, i.e. after 12, 17 and 34 vaccinations. We demonstrated anti-tumor T cell response successfully provoked by vaccine peptides. Molecular T cell receptor analysis revealed a broad vaccine-reactive TCR repertoire with clones of discernible specificity. Four identical or convergent TCR sequences were identified at multiple time-points, indicating persistence of vaccine-reactive T cells. The patient exhibited 6-year recurrence-free survival without any sign of adverse events, suggesting clinical benefit from the observed T cell responses.

In the second part of this dissertation, 15 NSG mice transplanted with CD34<sup>+</sup>-selected, CD3<sup>+</sup>-depleted human stem cells were examined. We showed that CD34<sup>+</sup> human stem cells transplanted into mice expand *in vivo* and that 2 of the 15 grafts at 24th week or later induced a systemic, autoimmune symptoms mimicking chronic GvHD in lung, liver, skin, gingiva and intestines. These two grafts differed from the other 13 donors in HLA characteristics. Both GvHD-inducing grafts showed a haplotype associated with an increased risk of developing autoimmune diseases, defined as HASEH: human autoimmunity susceptibility extended HLA haplotypes.

The reactive T cells were CD4<sup>+</sup> T<sub>H2</sub> cells with autoreactive CDR3 regions. In the affected tissues of the mice, these reactive T cells secreted abundant profibrotic cytokines such as IL-13 and IL-4, and caused sclerodermatic skin, fibrotic lung, various pathologies of hepatitis and massive tooth deformations leading to loss of teeth. The most remarkable characteristics of this CD34<sup>+</sup> NSG model is that neither thymus-derived regulatory T cells (nTreg) nor B cells were involved. This illustrates the role of genetic polymorphism and cytokines in terms of pathogenesis of cGvHD. This model induces the late-onset autoimmunological pathology in multiple organs and therefore is suitable for studying the pathophysiology of human cGvHD and for investigating its new treatment strategies.

## Publikationsliste der kumulativen Dissertation

Die vorliegende Dissertation bezieht sich auf Forschungsdaten dieser zwei, bereits in Fachzeitschriften, veröffentlichten Publikationen:

**Sonntag K**, Eckert F, Welker C, Müller H, Müller F, Zips D, Sipos B, Klein R, Blank G, Feuchtinger T, Schumm M, Handgretinger R, Schilbach K.

*Chronic graft-versus-host-disease in CD34(+)-humanized NSG mice is associated with human susceptibility HLA haplotypes for autoimmune disease.* Journal of Autoimmunity 08/2015

**Sonntag K**, Hashimoto H, Eyrich M, Menzel M, Schubach M, Döcker D, Battke F, Courage C, Lambertz H, Handgretinger R, Biskup S, Schilbach K.

*Immune monitoring and TCR sequencing of CD4 T cells in a long term responsive patient with metastasized pancreatic ductal carcinoma treated with individualized, neoepitope-derived multipeptide vaccines: a case report.* Journal of Translational Medicine 02/2018

**Erklärung nach § 5 Abs. 2 Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.  
Fakultät**  
**-Anteil an gemeinschaftlichen Veröffentlichungen-  
Nur bei kumulativer Dissertation erforderlich!**

Name: Katja Kühn (geb. Sonntag)

**List of Publications**

1. Sonntag K<sup>1</sup>, Hashimoto H<sup>1</sup>, Eyrich M<sup>2</sup>, Menzel M<sup>3</sup>, Schubach M<sup>4</sup>, Döcker D<sup>3</sup>, Battke F<sup>3</sup>, Courage C<sup>5</sup>, Lambertz H<sup>6</sup>, Handgretinger R<sup>1</sup>, Biskup S<sup>3</sup>, Schilbach K<sup>7,8</sup>.

*Immune monitoring and TCR sequencing of CD4 T cells in a long term responsive patient with metastasized pancreatic ductal carcinoma treated with individualized, neoepitope-derived multi-peptide vaccines: a case report.*

2. Sonntag K<sup>1</sup>, Eckert F<sup>2</sup>, Welker C<sup>1</sup>, Müller H<sup>3</sup>, Müller F<sup>1</sup>, Zips D<sup>4</sup>, Sipos B<sup>3</sup>, Klein R<sup>5</sup>, Blank G<sup>1</sup>, Feuchtinger T<sup>6</sup>, Schumm M<sup>1</sup>, Handgretinger R<sup>1</sup>, Schilbach K<sup>7</sup>.

*Chronic graft-versus-host-disease in CD34(+)-humanized NSG mice is associated with human susceptibility HLA haplotypes for autoimmune disease.*

Nr.	Accepted publication yes/no	List of authors	Position of candidate in list of authors	Scientific ideas by the candidate (%)	Data generation by the candidate (%)	Analysis and Interpretation by the candidate (%)	Paper writing done by the candidate (%)
			<i>Optionally, you can also declare the above-stated categories in a written statement on a separate sheet of paper.</i>				
<b>1</b>	Yes	12	1				
<b>2</b>	Yes	13	1				

## **Author contribution in publications submitted for my doctoral thesis**

### **Paper 1**

*Immune monitoring and TCR sequencing of CD4 T cells in a long term responsive patient with metastasized pancreatic ductal carcinoma treated with individualized, neoepitope-derived multi-peptide vaccines: a case report.*

In dieser Arbeit habe ich den überwiegenden Anteil der Methoden eigenständig durchgeführt: Isolation von PBMCs, FACS-Analysen, T-Zellisolation und T-Zellkultur, IFN- $\gamma$  Catch Assay, Nukleinsäureisolation, cDNA-Synthese, Spektrotypisierung, Sanger-Sequenzierung und RT-PCR zum Nachweise von Genexpressionen. Die Daten habe ich ausgewertet und gemeinsam mit Prof. K. Schilbach analysiert und interpretiert. Die Abbildungen für das Manuskript habe ich angefertigt, zur Erstellung des Manuskripts beigetragen und die finale Version Korrektur gelesen. Prof. K. Schilbach konzipierte und betreute die Studie und schrieb gemeinsam mit Dr. H. Hashimoto das Manuskript. Prof. M. Eyrich las und korrigierte das Manuskript. Die Firma Cegat (Dr. M. Menzel, Dr. D. Döcker, Dr. F. Battke, Dr. Dr. S. Biskup) identifizierte aus dem Patientengewebe/ Tumormaterial über NGS die Impfpeptide. Dr. C. Courage stellte die Patientendaten zusammen und Dr. H. Lambertz injizierte die Impfungen. Prof. R. Handgretinger stellte die Laborräume zur Verfügung.

## **Paper 2**

*Chronic graft-versus-host-disease in CD34(+)-humanized NSG mice is associated with human susceptibility HLA haplotypes for autoimmune disease*

In dieser Arbeit habe ich gemeinsam mit TA F. Müller, Dr. F. Eckert und Prof. K. Schilbach die Organe der Tiere für die Histologie und die Molekularbiologie entnommen und entsprechend aufgearbeitet. Die Spekatypisierung und RT-PCR der Zellen aus den Organen/ Geweben der Mäuse habe ich völlig alleine durchgeführt, die Analyse und Interpretation der Daten erfolgte gemeinsam mit Prof. K. Schilbach. Die Abbildungen des Manuskripts habe ich angefertigt und zur Erstellung des Manuskripts beigetragen. Dr. F. Eckert und Dr. G. Blank spritzten den Mäusen wöchentlich das Fusionsprotein Fc-IL7 um das Engraftment zu erhalten. Prof. K. Schilbach konzipierte und betreute die Studie und schrieb das Manuskript. Doktorand C. Welker führte die FACS-Messung durch und TA F. Müller übernahm die immunhistochemischen Färbungen, die Prof. H. Müller gemeinsam mit Prof. B. Sipos auswertete und interpretierte. Prof. R. Klein war für den Serumnachweis auf B-Zellen und die HLA-Bestimmungen zuständig. Von Prof. T. Feuchtinger und Dr. M. Schumm erhielten wir die anonymisierten Angaben zum klinischen Verlauf der Rezipienten nach HSCT. Prof. R. Handgretinger stellte die Labore bereit, übernahm die Tierkosten und die Abgabe der CD34<sup>+</sup> Stammzellen.



I confirm that the above-stated is correct.

---

Date, Signature of the candidate

I/We certify that the above-stated is correct.

---

Date, Signature of the doctoral committee or at least of one of the supervisors



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Ein gesundes Immunsystem schützt uns vor pathogenen Mikroorganismen, entarteten und fremden Zellen sowie vor Autoimmunerkrankungen. Es besteht aus einer angeborenen (unspezifischen) und erworbenen (spezifischen) Abwehr.

Das angeborene Immunsystem weist ein breites Wirkungsspektrum auf, reagiert unspezifisch aber effektiv mit dem Ziel unmittelbar nach einer Infektion pathogene Keime zu beseitigen. Zu dem angeborenen Immunsystem zählen natürliche Barrieren wie Oberflächenepithelien und Schleimhäute, die humorale Komponente (Komplementsystem) und Abwehrzellen, wie Granulozyten und Makrophagen. Letzteres hat die Aufgabe eingedrungene, fremde Mikroorganismen durch Phagozytose zu eliminieren, Zytokine und Chemokine freizusetzen um weitere neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen zu rekrutieren. Die Zellen des angeborenen Immunsystems spielen eine große Rolle bei der Aktivierung des erworbenen Immunsystems. Zu der erworbenen Immunabwehr gehören die T- und B-Lymphozyten, sie reagieren auf spezifische körperfremde Antigene. Die B-Lymphozyten zählen zu der humoralen Immunabwehr, die Antigene binden können. Die gebundenen Antigene werden gemeinsam mit dem Rezeptor internalisiert, proteolytisch gespalten und als Peptid (max. 30 Aminosäuren) über den Haupthistokompatibilitätskomplex (*engl. major histocompatibility complex*: MHC) der Klasse II den T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup> T-Zellen) präsentiert [1]. Diese sezernieren daraufhin Zytokine, welche die B-Zellen aktivieren und zur Bildung spezifischer Antikörper (Immunglobuline), die das Antigen binden können, anregen. Nach dem direkten Antigenkontakt werden sie zu Effektorzellen, die letztendlich zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen differenzieren [2].

Die T- und B-Lymphozyten bilden den zellulären Anteil der adaptiven Immunabwehr. Die T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche einen Antigenrezeptor, der ebenfalls Antigene erkennen und binden kann, wenn diese über MHC I oder MHC II (siehe Abschnitt 1.1.3 Haupthistokompatibilitätskomplex) präsentiert werden [3].

Das antigenpräsentierende Molekül MHC I wird von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und dient der Präsentation zytosolischer Proteine. Dazu zählen auch virusinfizierte oder entartete Zellen, die virale oder „fremde“ zytosolische Peptide (wie z.B. Tumor-assoziierte Peptide/ mutierte Selbstpeptide) präsentieren und von

zytotoxischen T-Zellen (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) erkannt werden. Dabei setzen CD8<sup>+</sup> T-Zellen Perforin und Granzyme frei, was zur Zellyse infizierter Zellen führt oder sie induzieren über CD95 (Fas-Protein) Apoptose [4].

MHC II wird von antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen (DC), B-Zellen) sowie von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert und präsentiert extrazelluläre über Endozytose aufgenommene und prozessierte Antigene. Diese extrazellulären Proteine werden von T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) erkannt [5].

T-Helferzellen können durch Freisetzung von Lymphokinen, zwei Arten von Immunantworten induzieren. Die T<sub>H1</sub> Antwort, maßgeblich initiiert durch Interleukin (IL)-12, das überwiegend von Makrophagen sezerniert wird, ist weiterhin gekennzeichnet durch die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und IL-2. Die T<sub>H2</sub> Antwort resultiert überwiegend in der Sekretion von IL-4, IL-10, IL-5, IL-13, fördert die humorale Immunität und regt B-Zellen zur Antikörperproduktion an. Überschießende T<sub>H1</sub> Antworten können die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung begünstigen sowie T-Zellen, die IL-17 freisetzen [6], während eine unkontrollierte T<sub>H2</sub> Antwort mit atopischen und allergischen Symptomen einhergeht [7].

### 1.1.1 T-Lymphozyten vermittelte Immunreaktion

T-Zellen spielen neben der allg. Immunreaktion gegen Pathogene und Infektionen eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Eliminierung entarteter Zellen (Tumorzellen). Nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) ist es neben den natürlichen Killerzellen auch die Aufgabe der T-Zellen Tumorzellen zu erkennen und zu beseitigen und den sogenannten Graft-versus-Tumor (GvT) oder Graft-versus-Leukämie (GvL) Effekt zu erzielen. Andererseits sind es ebenso die T-Zellen, die nach einer HSCT die Abstoßungsreaktion bzw. die Graft-versus-Host-Disease (GvHD) verursachen. Es ist und bleibt die Herausforderung, bei allogenen transplantierten Tumorpatienten den GvT Effekt zu fördern und dabei gleichzeitig die GvHD zu hemmen [8].

Ob T-Zellen Tumorzellen erkennen und eliminieren oder im Falle einer Transplantation, die Zellen des Empfängers angreifen, ist von einer Reihe von Faktoren abhängig, wie z.B. von deren Zugehörigkeit zum Immunkompartiment, (naive-, Gedächtnis- oder senescente- T-Zellen) und von ihrer Aktivierung (im Kontext mit Sekundärsignalen, im Kontext mit selbst MHC, im Kontext mit einer Inflammation,

im Kontext mit potenter zentraler Toleranz, im Kontext mit sogenannten *susceptibility* MHC Liganden). Diese eher allgemeinen Rahmenbedingungen sind für die Bildung bzw. die Unterdrückung einer Immunantwort von erheblicher Bedeutung. Sie sind in konzentrierter Aktion sogar wichtiger als die Spezifität, Affinität bzw. Avidität der hochspezifischen TCRs der T-Zellen. Die Spezifität des T-Zellrezeptors trägt unter physiologischen Steady-state-Bedingungen zu einer kontrollierbaren und spezifischen Erkennung von Antigenen bei. Zudem exprimiert jede T-Zelle einen individuellen Antigen-spezifischen Rezeptor, das ist nötig um eine breitgefächerte und spezifische Immunabwehr zu gewährleisten.

### 1.1.2 Aufbau des T-Zellrezeptors

T-Zellrezeptoren (TCR) sind membrangebundene Heterodimere, die sich aus einer TCR $\alpha$ -Kette und einer TCR $\beta$ -Kette oder aus einem Heterodimer einer TCR $\gamma$ -Kette und TCR $\delta$ -Kette zusammensetzen [9].

Die TCR $\alpha$ -Kette und TCR $\gamma$ -Kette setzt sich aus 3 Komponenten zusammen, einer variablen (V) Region, einem Verbindungsstück (*engl. Joining* (J)) und abschließend aus einer konstanten (C) Region. Die TCR $\beta$ -Kette und TCR $\delta$ -Kette sind analog aufgebaut, besitzen zusätzlich zwischen der V und J Region eine D Region, die Diversität kreiert [10]. Nach Translation der entsprechenden Rezeptoren, bilden die beiden Rezeptoren, TCR $\alpha$  mit TCR $\beta$  sowie TCR $\gamma$  mit TCR $\delta$ , über eine Disulfidbrücke mit den Cysteinresten der jeweiligen C Region, ein funktionelles TCR-Heterodimer, das nach Glykosylierung an die Zelloberfläche transportiert wird [11].

Das TCR $\alpha\beta$  Heterodimer lässt sich durch die oben beschriebene Strukturierung der molekularen Komponenten des TCR in 6 hoch variable Regionen (Abb.:1), jeweils 3 sogenannten CDRs (*engl. complementarity determining region*) pro Rezeptor einteilen, die für die Bindung mit dem MHC und dem Antigen entscheidend sind [11]. Die CDR1 und CDR2 Loops sind keimbahnkodiert (*engl. germline encoded*). Sie werden durch die variable Region der  $\alpha$  (TRAV) und  $\beta$  (TRBV) Proteine gebildet und sind für die Bindung des MHCs zuständig.

Die Vielzahl unterschiedlicher TCRs basiert auf somatischer Rekombination aus jeweils einem der 47 TRAV und der 57 TRAJ mit dem einem TRAC Segment. Allein mit diesen 105 Genen sind 2679 unterschiedliche VJC Rekombination der  $\alpha$ -Kette möglich. Der TCR $\beta$  Locus besitzt 54 TRBV, 2 TRBD, 13 TRBJ und 2 TRBC Segmente.

Die VDJC Rekombination der 71  $\beta$ -Genen entspricht 2808 unterschiedliche  $\beta$ -Ketten [12].

Die Diversität der T-Zell-Rezeptoren wird zusätzlich durch die Desoxynukleotidyltransferase erhöht, die zum Zeitpunkt der V (D) J-Rekombination spezifisch Nukleotide, sogenannte *nontemplate* (N) Nukleotide, zu den freien 3'-Enden hinzufügt [13]. Dieser somatische hypervariable Abschnitt wird als CDR3 Loop bezeichnet und entspricht dem Abschnitt, der spezifisch für die Peptidbindung ist. Insgesamt wären 7522632 Genkombinationen des TCR $\alpha\beta$  möglich aber gerademal 5-10 % dieser potentiellen Genvielfalt wird tatsächlich auch gebildet [14]. Diese Vielfalt steht im Zusammenhang mit dem Gesundheitszustand des Menschen. Je größer die Vielfalt, desto größer die Chance, dass eine Zelle gegen eine spezifische Infektion reagieren kann [15].

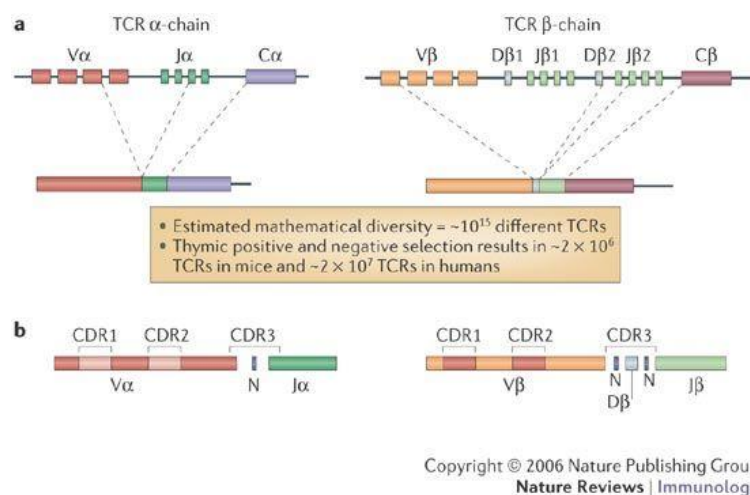


Abb.1: Schematische Darstellung der somatischen Rekombination und Zusammensetzung der TCR Gensegmente [16].

Liganden der T-Zellen sind Peptide (Antigene), deren N-Terminus mit der CDR3 Region der  $\alpha$ -Kette und deren C-Terminus mit der CDR3 Region der  $\beta$ -Kette interagiert [11].

Nach einer Bindung zwischen Peptid-MHC (pMHC) und TCR werden die T-Zellen nur im Kontext mit entsprechenden Signalen (die genauer im Abschnitt 1.3 T-Zellaktivierung, erläutert werden) aktiviert, folglich eine intrazelluläre biochemische

Signalkaskade in Gang gesetzt, die zu einer zellulären Proliferation, Differenzierung, Effektorfunktion und/oder Aktivierung des induzierten Zelltods führt.

Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen, bilden die kleinere Zellpopulation der T-Lymphozyten und befinden sich überwiegend in der Haut und in den Epithelien. Die Besonderheit der  $\gamma\delta$ -T-Zellen besteht darin, dass sie direkt mit dem Antigen interagieren können ohne MHC [11].

### 1.1.3 Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse I und II

MHC Moleküle sind ebenfalls mit der Membran verankert, glykosyliert und werden auf der Zelloberfläche präsentiert. Es gibt MHC Klasse I und Klasse II, die aus sehr ähnlichen aber nicht identischen Strukturen aufgebaut sind. Beide Klassen sind Heterodimere aus drei Domänen, einer Peptid-Bindedomäne und zwei Ig-ähnlichen Domänen. Die spezifische Peptid-Bindetasche besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices (MHC I:  $\alpha 1\alpha 2$ , MHC II:  $\alpha 1\beta 1$ ) die die Ränder der Tasche bilden und das 7-blättrige  $\beta$ -Faltblatt, das den Boden darstellt [11].

Die CDR1- und CDR2-Region der TCR $\alpha$ - oder  $\beta$ -Ketten binden an die  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Helix des MHC I bzw. an die  $\alpha 1$ - und  $\beta 1$ -Helix des MHC II [17, 18].

MHC Klasse I setzt sich aus sechs verschiedenen HLAs (humane Leukozytenantigenen) zusammen, jeweils der gesamte Haplotyp HLA-A, HLA-B, HLA-C einmal maternal und einmal paternal.

Über den MHC I präsentierte Peptide sind 8-10 Aminosäuren lang und über sogenannte Ankerpositionen sowie an den Enden mit der spezifischen Tasche des MHC Moleküls verbunden. Peptide, die zwischen 11 und 15 Aminosäuren lang sind, können ebenfalls von MHC I Molekülen gebunden werden [19] durch Auswölbung der zentralen Reste [20, 21] oder durch überstehende Aminosäuren des C-Terminus [22]. Sie dissoziieren wesentlich schneller vom MHC Molekül ab als Peptide mit optimaler Länge und Aminosäuresequenz. Aufgrund der unterschiedlichen Ankerpositionen, die sich von MHC-Allel zu MHC-Allel unterscheiden, variiert die optimale Bindungslänge und -position der Peptide [11].

MHC Klasse II ist auf allen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) vorhanden und wird ebenfalls von 6 HLA Molekülen kodiert, HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP jeweils maternal und paternal. Bei MHC II sind die Bindungstaschen an beiden Enden offen, sodass Peptide, die präsentiert werden auch wesentlich länger sein können und an

den Enden überstehen. Das Peptid ist im gesamten Bindungsbereich mit der Grube verankert und die Ankerstellen sind etwas tiefer ausgeprägt als bei MHC I [11].

#### 1.1.4 T-Zellaktivierung

Die T-Zellaktivierung, vermittelt durch den T-Zell-Antigenrezeptor, unterliegt einer strengen Regulation um Fehlfunktion mit pathologischen Konsequenzen wie Autoimmunerkrankungen oder Allergien zu vermeiden.

Für eine optimale Immunantwort sind drei Signale notwendig: TCR-Engagement, Kostimulation und Zytokinstimulation [23].

Der erste Schritt zur Aktivierung ist die Erkennung und Bindung des TCR naiver T-Zellen an den MHC und das von ihm präsentierte Antigen. Das zweite entscheidende Signal erfolgt durch die Interaktion zwischen einem oder mehreren kostimulatorischen Molekülen der T-Zellen und den dazugehörigen Liganden der APCs [24]. Eines der frühen kostimulatorischen Signale ist CD28, das auf allen naiven T-Zellen vorkommt. Fehlt das Signal bei einer TCR Stimulation, kann die T-Zelle nicht aktiviert werden und wird anerg [25]. Die Bindung zwischen CD28 und seinem Liganden, B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), Oberflächenmoleküle der APCs, fördert das TCR-Signaling, die IL-2 Freisetzung, die klonale Expansion und die Differenzierung zu Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen [26]. Ein weiteres kostimulatorisches Signal, das wichtig für eine Antigen-spezifische T-Zellantwort ist, sind CD40 und CD40L (CD154), Mitglieder der TNF-TNF-R Superfamilie, die nach Aktivierung der geprimten T-Zelle exprimiert werden. CD40 wird konstitutiv auf B-Zellen, DCs, Makrophagen und Thymusepithel exprimiert und kann während einer Entzündung auf Endothelzellen und Fibroblasten verstärkt induziert werden [27]. CD40L wird auf aktivierten T-Zellen, NK-Zellen und Eosinophilen exprimiert [28]. Die Interaktion von CD40-CD40L verbessert die Antigenpräsentation und reguliert die Expression kostimulatorischer Moleküle (CD80 / 86) hoch [28]. Das dritte Signal benötigen hauptsächlich naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die Differenzierung zu Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen [29]. Es gibt zwei Wege um eine Antigen-spezifische CD8 T-Zellantwort zu verstärken, zum einen über CD4<sup>+</sup> T-Zellhilfe und zum anderen durch inflammatorische Zytokine.

CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzieren IL-2, das jedoch nur eine geringfügige Rolle bei der primären CD8<sup>+</sup> T-Zellreaktionen auf virale Infektionen oder zelluläre Antigene spielt aber sehr wichtig für die Entwicklung von funktionellen CD8<sup>+</sup> Gedächtnis T-Zellen ist besonders nach Immunisierung mit Peptid beladenen dendritischen Zellen.

Analog verhält es sich bei der Alloreaktion, eine alloreaktive CD8 T-Zellantwort sowie die Abstoßung des Allotransplantats erfolgt ohne CD4-Hilfe, jedoch die optimale alloreaktive CD8-T-Zellantworten bezüglich Frequenz und Funktionalität erfordert die Hilfe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen [30].

### 1.1.5 Zentrale und periphere Immuntoleranz

T-Zellen müssen ständig zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen unterscheiden um eine Immunreaktion gegen körpereigenes Gewebe zu verhindern. Versagen die Mechanismen der Selbsttoleranz kommt es zur Autoimmunerkrankung. Es gibt 2 Formen der Immuntoleranz, die zentrale und die periphere Toleranz. Die zentrale Toleranz erfolgt im primären lymphatischen Gewebe (Knochenmark oder Thymus). Die TCRs entstehen durch somatische Rekombination nach Zufallsprinzip. T-Zellen mit autoreaktiven TCRs werden während ihrer Reifung im Thymus aussortiert (Negativselektion). Nur 1-2 % der Thymozyten können einen reifen T-Zellstatus erreichen bevor sie aus dem Thymus freigesetzt werden [31, 32].

In der Peripherie reagieren viele T-Lymphozyten auf Fremdantigene und weisen gleichzeitig eine gewisse Selbstreaktivität auf. Das liegt zum einen daran, dass reife T-Zellen eine niedrige Affinität zu selbst MHC-Peptid-Komplexen haben und zum anderen ein kleiner Anteil an T-Zellen, der Negativselektion im Thymus entkommen [33]. Damit auch in der Peripherie Autoimmunität verhindert wird, folgt eine zweite Form der Toleranz (periphere Toleranz) durch Induktion von Anergie bzw. Apoptose in  $\alpha\beta$ -T-Zellen und durch die Suppression ihrer Proliferation mit Hilfe regulatorischer T-Zellen (Treg).

T-Zellen, die nach Antigenbindung weder proliferieren noch kostimulatorische Signale (IL-2 oder IL-4) freisetzen werden anerg. Wird dagegen ein Antigen sehr stark exprimiert oder überexprimiert geht die dafür spezifische T-Zelle in die Apoptose und über induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg) werden TGF- $\beta$  (*engl. Transforming Growth Factor- $\beta$* ) und IL-10 in sekundären lymphatischen Organen oder am Entzündungsort ausgeschüttet, die ebenfalls einen supprimierenden Einfluss auf die umliegenden Zellen (T-Zellen) haben [34].

## 1.2 Tumormunologie

Tumorzellen sind entartete Zellen mit zellphysiologischen Veränderung wie autonomes Wachstum, Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen,

vermeiden von Apoptose, Induktion von Angiogenese, uneingeschränktes Replikationspotenzial und Gewebeinvasion mit Metastasierung [35]. Nicht nur entartete Zellen sondern auch das umliegende Stroma, also das Tumormikromilieu, sind dabei entscheidend. Hinzukommen die Anpassung des Energiestoffwechsels und Mechanismen, die eine Tumorzelle entwickelt um das Immunsystems zu umgehen [36]. Die Veränderung der Immunogenität der Tumorzellen bis hin zur Entstehung immunresistenter Varianten ist ein dynamischer Prozess zwischen Immunüberwachung und Tumorprogression. Das sogenannte Immunoediting ist ein Wechselspiel von Tumor und Immunsystem und wird in 3 Phasen gegliedert (Abb.:2). In der ersten Phase, der sogenannten Eliminationsphase erkennt das Immunsystem maligne transformierte Zellen und zerstört sie. Die darauffolgende Gleichgewichtsphase (Equilibrium) tritt ein, wenn Tumorzellen der Eliminierung entkommen. Es liegt ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Tumorwachstum und Immunsystem vor. Das adaptive Immunsystem schafft es noch, das Tumorwachstum zu hemmen und eine Ausbreitung zu verhindern. In dieser Phase spricht man auch von „Tumor Dormancy“, ein Dauer-Ruhe-Zustand in denen Tumorzellen durch das Immunsystem in Schach gehalten werden. In der letzten Phase des Immunoeditings (Escape) hat das Immunsystem keine Kontrolle mehr über die Tumorzellen, die es durch folgende Escape-Mechanismen und durch Selektion geschafft haben, Resistenzen gegenüber dem Immunsystem zu entwickeln. Es kommt zur klinischen Manifestation [37].

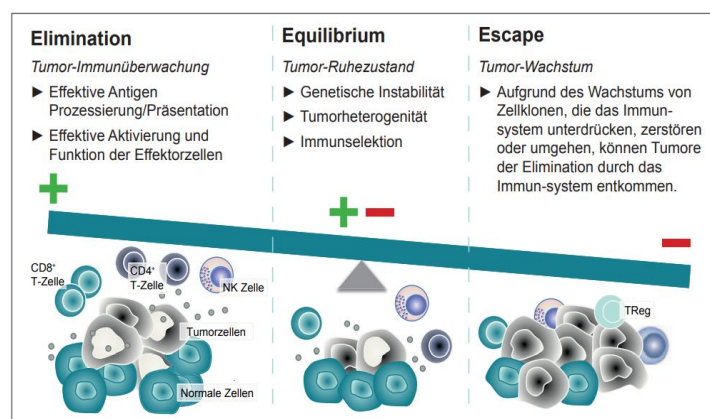


Abb.2: Prozess des Immunoediting [37]

Zu den Escape-Mechanismen zählen immunsuppressive Mechanismen wie die der regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>) [38] und verschiedene Zytokine (IL-4,



IL-10, TGF- $\beta$ ), die eine Gleichgewichtsverschiebung der Immunantwort von T<sub>H1</sub> zu T<sub>H2</sub> bewirken [39].

Zusätzlich können Tumorzellen VEGF (*engl. Vascular Endothelial Growth Factor*) freisetzen, das die Differenzierung der Vorläuferzellen zu DCs hemmt. Der unreife Phänotyp kann den T-Zellen weder das Antigen noch die entsprechende Kostimulation präsentieren und verhindert somit die Immunreaktion [40]. Tumorzellen können die Antigen-Prozessierung herunterfahren [41], die Expression von Tumorantigenen, kostimulatorischen- und MHC I-Molekülen unterdrücken und eine Toleranz oder Anergie von T-Zellen induzieren [42]. Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie PD-L1 (*engl. programmed cell death ligand*), das die Deletion oder Anergie Tumor-reaktiver T-Zellen bewirkt [43].

### 1.2.1 Immuntherapien

Ziel der Immuntherapie ist es, das eigene Immunsystem zu nutzen, um entartete Zellen zu erkennen und zu bekämpfen. Bekannte Immuntherapien sind Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI), CAR- (*engl. chimeric antigen receptor*) adoptive T-Zelltherapie und verschiedene anti-Tumor-Impfstoffe (z.B. gegen die Antigene NY-ESO und MART1). Immuntherapie zählt heute neben einer Operation, Strahlentherapie und Chemotherapie zu den vier angewandten Verfahren der Krebstherapie [44]. Im Folgenden werden kurz einige T-Zellen betreffende immuntherapeutische Verfahren vorgestellt.

#### 1.2.1.1 Immun-Checkpoint-Inhibitoren

Bisher gibt es 2 bekannte Oberflächenmoleküle (CTLA-4 und PD-1), sogenannte Checkpoints, die T-Zellen in ihrer Aktivität hemmen und eine Immunreaktion unterdrücken können [45]. Sie sind wichtig für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und schützen vor Überreaktion des Immunsystems [46].

CTLA-4 (*engl. cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*) wird in erster Linie auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert und ist homolog zu CD28, mit dem Unterschied, dass es eine viel höhere Bindungsaffinität (etwa 10-100fach höher) zu B7 hat und kein stimulierendes TCR-Signal erzeugt. Das Verhältnis CD28:B7 zu CTLA-4:B7 bestimmt, ob T-Zellen aktiviert oder anerg werden. Zudem wirkt die CTLA-4:B7 Bindung inhibitorisch auf CD28 bzw. auf dessen Signalkaskade sowie auf die immunologische Synapse und die Wechselwirkung der T-Zellen mit den APCs [46].

Mit dem Checkpoint-Inhibitor Ipilimumab wird der Rezeptor CTLA-4 blockiert und der anti-tumorale Effekt in der frühen Phase der T-Zellaktivierung verstärkt. Dieser Antikörper wurde zur therapeutischen Behandlung zugelassen und zeigt große Erfolge bei Patienten mit Melanom [47].

PD-1 (*engl. programmed cell death protein*) wird auf aktivierten T-Effektorzellen und der Ligand PD-L1 oder PD-L2 auf APCs sowie auf Tumorzellen exprimiert. Infolge einer Bindung wird das TCR-Signal und somit die Aktivierung der T-Zellen beendet. [46] .

In der Klinik wird bereits Pembrolizumab (PD-1-Inhibitor) bei Patienten mit Melanom und Lungenkarzinom eingesetzt [48].

Der Nachteil dieser Immuntherapie, nicht jeder betroffene Patient reagiert auf Immun-Checkpoint-Inhibitoren und besonders bei CTLA-4 Inhibitoren besteht zusätzlich ein hohes Risiko für überschießende Reaktionen wie Autoimmunerkrankung [49].

#### **1.2.1.2 CAR – T-Zellen Therapie**

CAR-T-Zellen sind genetisch veränderte T-Zellen, die auf ihrer Oberfläche einen rekombinanten Rezeptor tragen, der definierte Oberflächenmoleküle, die auf der Tumorzellen exprimiert werden, erkennt [50], daran bindet und eine Immunreaktion induzieren kann.

Der rekombinante Rezeptor besteht aus einer extrazellulären Antigen-Erkennungsdomäne die über einen Spacer und eine Transmembrandomäne mit der intrazellulären Signaldomäne verbunden ist [51]. Der Vorteil dieser T-Zellen, sie können unverarbeitete Antigene direkt erkennen, unabhängig von der Expression der MHCs und ohne vorangegangene Prozessierung und Präsentation der Antigene über APCs. Daher können CAR-T-Zellen auch auf Tumore reagieren, die aufgrund der Escape-Mechanismen, wie der Runterregulation der HLA-Expression oder der proteasomalen Antigenverarbeitung, einer normalen T-Zellerkennung entkommen würden [52].

In dieser Therapie werden T-Zellen des Patienten per Leukapherese isoliert, mit CARs transduziert, um anschließend einen chimären Antigenrezeptor zu exprimieren der gegen ein bestimmtes Target gerichtet ist. Die T-Zellen werden expandiert und nach Konditionierung, also nach hochdosierter Chemotherapie, wieder in den Patienten reinjiziert [51].

Dieses Verfahren, das seit 2018 auch in Deutschland zugelassen ist [53], zeigt nur bei bestimmten hämatologischen Krebserkrankungen, wie z.B. bei B-Zell Leukämien, Erfolge [54], benötigt viel Expertise und ist kompliziert in der Herstellung. Zudem treten starke Nebenwirkungen auf, die durch hohe Entzündungen (Zytokin-Releasing-Syndrom) hervorgerufen werden [55].

### **1.2.1.3 Anti-Tumor-Vakzine und Adjuvantien**

Die Patienten-individuelle anti-Tumor-Impfung stellt heutzutage eine der zentralen Chancen und Herausforderungen der modernen Medizin dar mit wenigen Nebenwirkungen.

Ein erfolgreicher Impfstoff sollte gezielt gegen Tumor-spezifische Antigene (Neoantigenen) gerichtet sein, Adjuvantien beinhalten, die APCs aktivieren, die wiederum Antigen-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) stimulieren. Außerdem ist die richtige Injektionsstelle von großer Bedeutung sowie die Verabreichung des Impfstoffes in definierten Abständen und Dosen, um die immunologische Toleranz zu durchbrechen [56].

Bei der Wahl der Antigene unterscheidet man zwischen Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) und Tumor-spezifischen Antigenen (TSA).

TAA sind Gewebe-spezifische Antigene, die von Krebszellen überexprimiert werden z.B. Mammaglobin-A, Prostata-spezifisches Antigen (PSA), Melanom-Antigen (MART-1) [57].

TSA sind Proteine, die ausschließlich von Tumorzellen exprimiert werden und die prävalenten Zielantigene der Krebsimpfung sind (z.B. NY-ESO). T-Zellen, die auf TSAs (Neoantigene) reagieren, im Vergleich zu denen die auf TAA reagieren, unterliegen keiner zentralen immunologischen Toleranz und stellen daher keine potenzielle Gefahr für eine Autoimmunerkrankung dar [58]. Die TCRs weisen außerdem eine höhere Bindungsaffinität für den MHC-Neoantigen-Peptidkomplexe auf. Der überwiegende Anteil der Neoantigene betrifft „Passenger-Mutationen“, die nicht für das Überleben und schnelle Wachstum des Tumors verantwortlich sind. In den selteneren Fällen sind es „Driver-Mutationen“, die dem Tumor Überlebensvorteile bringen und für die schnelle Ausbreitung in anderem Gewebe sorgen [59]. Jedoch scheinen Antigene mit „Passenger-Mutation“, eine ähnliche immunogene Wirkung zu erzielen wie diejenigen mit einer „Driver-Mutation“ und eignen sich demnach genauso gut als Impfstoff [60].

Die fortschreitende Entwicklung in der Genomik und Bioinformatik ermöglicht es mittlerweile in relativ kurzer Zeit Tumor-spezifische Missens-Mutationen zu identifizieren und über Epitop-spezifische Vorhersagen, die auf den MHC des Patienten abgestimmt sind, individuelle anti-Tumor-Vakzine zu entwickeln. Neben der Bestimmung der Antigene ist die Wahl des richtigen Adjuvans für eine optimale Wirkung der Vakzine essenziell. Sie verbessern die Antigenaufnahme, Prozessierung und Präsentation durch DCs oder Makrophagen [61].

Idealerweise sollten Adjuvantien;

1. das Antigen vor sofortigem Abbau schützen und eine verlängerte Freisetzung sicherstellen,
2. eine effiziente Aufnahme des Antigens durch lokale APCs unterstützen und
3. eine vollständige APC-Aktivierung und somit eine starke Antitumor- $T_{H1}$  / CTL-Antwort induzieren und ein langfristiges immunologisches Gedächtnis initiieren [62].

Das älteste Mittel ist die Aluminiumverbindung (Alum), es bewirkt eine langsame Freisetzung des Antigens, ruft eine lokale Entzündung hervor und lockt verstärkt Makrophagen und Lymphozyten an [63]. Es ist aber nicht das Adjuvans der Wahl für Krebs-Impfstoffe, da es bevorzugt  $T_{H2}$  Reaktionen und Antikörperbildung induziert [62]. Derzeit gibt es zahlreiche Adjuvantien (Freund-Adjuvans-Analogen, Toll-like-Rezeptor-Liganden, CpG und immunstimulatorische Zytokine wie GM-CSF) die zur Verstärkung der immunogenen Wirkung eingesetzt werden.

Einer der wirkungsvollsten Adjuvantien für die Stimulation von anti-Tumor T-Zellen ist GM-CSF (*engl. Granulocyte/ Makrophage colony stimulating factor*), er aktiviert APCs, lockt massiv DCs an den Inokulationsort, die wiederum T-Zellen aktivieren und ist zusätzlich entscheidend bei der Überwindung der Immuntoleranz [64].

Das neueste Adjuvans mit großer potenter immunstimulatorischer Wirkung ist RNAAdjuvant® (CureVac AG). In ihrer Studie konnten Sie zeigen, dass RNAAdjuvant® bei Probanden mit HCC (*engl. Hepatocellular carcinoma*) CD80 und CD86 zusammen mit HLA-DR in CD14<sup>+</sup> Monozyten sowie in CD11c<sup>+</sup> myeloiden DC hochreguliert, folglich die Reifung von APCs und die Expression kostimulatorischer Moleküle aktiviert und eine effiziente adaptive Immunantwort fördert.

Darüber hinaus induziert RNAAdjuvant® eine ausgeglichene  $T_{H1}$  und  $T_{H2}$  Zytokinproduktion sowohl in HCC Patienten als auch in gesunden Probanden, die 6 Tage anhält [65]. Dieses lang anhaltende und stimulierende Milieu ist die beste

Voraussetzung für die Entwicklung einer ausgeglichenen Immunreaktion und hat großes Potenzial die bisherigen Adjuvantien zu ersetzen.

#### **1.2.1.4 Immunogener Zelltod (ICD)**

Die Kombination aus anti-Tumor-Impfstoff und anderen Therapeutika, die gezielt den immunsuppressiven Effekt des Tumors durchbrechen, verbessern die Wirkung der Vakzinierung [66]. Dazu zählen z.B. Checkpoint-Inhibitoren und/ oder gezielte Chemotherapien, die den immunogenen Zelltod induzieren [66].

Tumorzellen reagieren auf ICD (*engl. immunogenic cell death*) mit prämortalem endoplasmatischem Retikulum (ER)-Stress und Autophagie. Im präapoptotischen Zustand bilden Tumorzellen Calreticulin, das den DCs, die den passenden Rezeptor (CD91) exprimieren, signalisiert, dass die Zelle phagozytiert werden kann. Immer mehr DC werden Richtung Tumor rekrutiert und phagozytieren die Krebszellen um anschließend den T-Zellen die Tumorantigene zu präsentieren [67].

Unter optimalen Bedingungen werden so Tumorzellen durch Chemotherapie eliminiert und im Zuge dessen eine Tumor-spezifische Immunantwort ausgelöst. Bei Patienten mit Brustkrebs oder kolorektalem Tumor wurde mit Hilfe der Chemotherapeutika Anthrazykline oder Oxaliplatin eine gerichtete anti-neoplastische-Antigen Antwort induziert.

Oxaliplatin, ist ein Platinderivat und Teil des FOLFERINOX-Regimes (Fluorouracil / Leucovorin, Irinotecan, Oxaliplatin), das häufig bei der Behandlung von Bauchspeicheldrüsenkrebs eingesetzt wird [68, 69]. Darüber hinaus reduziert Oxaliplatin die Expression von PD-L2 und verstärkt so die Antigen-spezifische T-Zellproliferation und  $T_{H1}$  Zytokinsekretion [70], während Fluorouracil selektiv Apoptose in myeloiden Suppressorzellen induziert und die Treg-Aktivität abschwächt. Daher kann das FOLFERINOX-Regime entscheidende Vorarbeiten für eine Immuntherapie bewirken, indem es die Immunsuppression neutralisiert und Neoantigen-spezifische Immunität fördert [71-73].

### **1.3 Pankreaskarzinom und derzeitige Therapiemöglichkeiten**

Pankreaskarzinom ist eine schwere Erkrankung mit extrem hoher Morbidität und Mortalität, besonders bei Patienten mit fortgeschrittener und metastatischer Erkrankung. Die 5-Jahre Überlebensrate liegt bei weniger als 5 % [74-77]. Das duktale

Adenokarzinom des Pankreas (PDA) bleibt einer der am schnellsten fortschreitenden und tödlich verlaufenden, malignen Erkrankungen weltweit [78].

Die derzeitigen Therapiemöglichkeiten wie Chemotherapie, chirurgische Resektion und Bestrahlung können den Tumor nur in seinem Wachstum etwas hemmen aber nicht vernichten.

Zu den wenig effektiven Chemotherapeutika bei metastasierendem Pankreaskarzinom zählt z.B. Gemcitabin, ein Standardmittel, das jedoch bei Patienten im fortgeschrittenen Stadium, die Lebenserwartung kaum verlängert. Eine wesentlich bessere Wirkung zeigt FOLFERINOX [79], das allerdings aufgrund seiner hohen Nebenwirkungen, trotz bestätigter Wirksamkeit [80, 81], umstritten ist. Eine Alternative zu FOLFERINOX mit geringeren Nebenwirkungen ist Nab-paclitaxel [82], ein Albumin-Nanopartikel, das Paclitaxel gebunden hat und in Kombination mit Gemcitabin eine verbesserte Gesamtüberlebenszeit erreicht als Gemcitabin alleine [83].

Die chirurgische Resektion ist eine sehr vielversprechende Therapie, jedoch nur 20 % der Patienten haben einen potenziell entfernbaren Tumor [84, 85]. Bei den 20 % die eine Resektion erhalten, liegt die mittlere Überlebensrate bei 15-23 Monaten [86].

Trotz kompletter Resektion, Chemotherapie und/ oder Bestrahlung liegt die Überlebensrate bei dieser Patientenkohorte, auf 5 Jahre bezogen, bei nur 20 % [87]. Dies zeigt wie wichtig neue Behandlungsstrategien sind. In den letzten zehn Jahren hat sich viel in der Entwicklung von Impfstoffen zur Behandlung von Pankreaskarzinom getan.

In 90 der Pankreastumore wurden Punktmutationen im *kras2* Onkogen gefunden, das trotz Mutation konstitutiv als funktionelles Ras Protein gebildet wird [88-90]. Während der frühen Tumorgenese sind diese Punktmutationen essenziell zur Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps. Sobald es aktiviert wurde, initiiert Ras eine Signaltransduktionskaskade die wiederum die Proliferation fördert und die Invasion erhöht [91, 92]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese Ras-Antigene von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen erkannt werden [93, 94]. Durch den L-ras Impfstoff konnte die Lebenserwartung von Patienten mit Pankreaskarzinom auf 10 Jahre erhöht werden [95, 96].

Eine Vielzahl verschiedenster Impfstoffe wurde in den letzten Jahren in klinischen Studien getestet. Dazu gehören TAAs (*KIF20A* [97], *WT1*, *VEGF-R*, *hTERT* und *Her2 / neu* [98]), der rekombinante Impfstoff TRICOM (*MUC-1& CEA* [99], *G17DT* [100]), bestrahlte allogene Pankreaskrebszellen (*Algenpantucel-L* [101]) sowie

bestrahlte und genetisch modifizierte Tumorzellen, die GM-CSF sezernieren (GVAX), teilweise in Kombination mit lebenden aber abgeschwächten Mesothelin exprimierenden Listerien (CRS-207 [102]). Vorläufige Studien ergaben vielversprechende Ergebnisse, konnten jedoch keine signifikante Verbesserung bezüglich der Überlebensrate nachweisen. Auch Immun-Checkpoint-Inhibitoren, die gegen PD-1 und CTLA-4 gerichtet sind und bei anderen Krebsarten, wie Melanom und Lungenkarzinom, wirksam sind, zeigten bei PDA keinen Effekt [72].

Im Gegensatz zur anti-Tumor-Immuntherapie, in der T-Zellen die fundamental wichtige Rolle für das Langzeitüberleben spielen, sind T-Zellen in der Stammzelltransplantation die Mediatoren einer der gefürchtetsten letalen Komplikationen, der Graft-versus-Host-Disease.

#### **1.4 Graft-versus-Host-Disease**

Die HSCT ist eine vielversprechende Heilungsmethode bei intermediärer oder akuter Leukämie, die nicht durch Chemo- oder Strahlentherapie geheilt werden kann. In Deutschland sind es ca. 2500 allogene Transplantationen pro Jahr und die Anzahl steigt [103]. Durch einen gezielten GvL/GvT Effekt haben sich die Heilungschancen nach einer solchen Transplantation deutlich verbessert, unterstützt durch verbesserte infektiöse Prophylaxe, optimiertes Monitoring, immunsupprimierende Medikamente und perfektionierte Spenderauswahl. Doch bis heute bleibt die Wirksamkeit der Therapie durch die mögliche Entwicklung einer GvHD begrenzt [104].

In beiden Fällen (GvT und GvHD) reagieren die Spender (Graft) T-Zellen gegen die Empfänger (Host) Zellen, die Alloantigene exprimieren [105]. Bei unterschiedlichem MHC (mismatch) zwischen Spender und Empfänger besteht die Gefahr, dass monomorphe Proteine, die über den MHC des Empfängers präsentiert und von Spender T-Zellen als fremd erkannt werden, eine Immunreaktion auslösen. Bei einer Transplantation mit gleichen MHCs, kann es ebenfalls zu einer GvHD kommen indem die Spender T-Zellen minor Histokompatibilitätsantigene (miHAs) erkennen. Das sind polymorphe Gene bzw. Aminosäurepolymorphismen, die sich aufgrund des Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) zwischen Spender und Empfänger unterscheiden [106].

### **1.4.1 Akute Graft-versus-Host-Disease (aGvHD)**

An einer aGvHD erkranken 30-60 % der Patienten nach Transplantation, bei 15-31 % der Patienten verläuft diese Krankheit tödlich.

Inzidenz und Schweregrad einer aGvHD hängen u.a. direkt mit dem Grad des „Mismatches“ der HLA Proteine zwischen Spender und Empfänger zusammen [107, 108]. Trotz identischen MHC Transplantaten entwickeln 40 % der Transplantatempfänger eine aGvHD.

T-Zellen, die gegen miHAs (HA-1 und HA-2) mit hämatopoetischer Restriktion gerichtet sind, können einen GvL Effekt vermitteln während T-Zellen, die als Target ubiquitär vorkommende miHAs (HY und HA3) erkennen, eher eine lebensbedrohliche GvHD induzieren [109]. In beiden Fällen kann es aufgrund des inflammatorischen Milieus (pre-transplantationales Regime) zu einer schnellen T-Zellaktivierung kommen. Die aGvHD kann durch bestimmte Polymorphismen der Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN $\gamma$ ), also Zytokine, die am „Zytokinsturm“ einer GvHD beteiligt sind, verstärkt werden [110].

Klinisch prägt sich die aGvHD durch Dysfunktionen hauptsächlich in drei Organsystemen aus, Haut, Leber und Magen-Darmtrakt, während die Haut das am häufigsten und am schwersten betroffene Organ ist [111].

#### **1.4.1.1 Pathophysiologie der aGvHD**

Die Entwicklung der aGvHD kann in drei aufeinander folgenden Schritten eingeteilt werden.

##### **Aktivierung der APCs**

Vor jeder Transplantation erfolgt eine Konditionierung des Rezipienten, um die Abstoßungsreaktion zu verhindern. Das Gewebe bzw. die Zellen die dabei geschädigt werden, sezernieren inflammatorische Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6), die wiederum antigenpräsentierende Wirtszellen aktivieren [112].

##### **Aktivierung, Proliferation, Differenzierung und Migration der Spender T-Zellen**

Die aktivierten APCs präsentieren körpereigene Peptide, die von Spender T-Zellen als körperfremd erkannt werden, sie beginnen zu proliferieren und zu differenzieren.

Während der aGvHD werden besonders T<sub>H1</sub> Zytokine (IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$ ) in großen Mengen produziert und freigesetzt. Die Freisetzung des Lipopolysaccharid



(LPS) durch die geschädigte Darmschleimhaut führt zu einer verstärkten TNF $\alpha$  Produktion [112].

### **Zielgewebszerstörung / Effektorphase**

Die Effektorphase dieses Prozesses ist eine komplexe Kaskade aus zellulären Mediatoren (zytotoxischen T-Lymphozyten, NK-Zellen) und inflammatorischen Mediatoren (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 und Stickstoffmonoxid) [113, 114], die gemeinsam die lokale Gewebsverletzung verstärken, die Entzündung fördern und letztendlich das Gewebe zerstören. Das Antigen-spezifische Abtöten von Zielzellen erfolgt hauptsächlich über den Perforin-Granzyme Weg und über die Fas - Fas-Liganden Interaktion. Beide Wege können von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) induziert werden [115].

### **1.4.2 chronische Graft-versus-Host-Disease (cGvHD)**

Die Haupttodesursache nach einer HSCT beim Erwachsenen ist nach wie vor die cGvHD [116], sie tritt bei 50 % der transplantierten Patienten auf, 25 % davon sterben. Es gibt drei Formen der cGvHD; „*de novo* GvHD“, tritt ohne vorangegangener aGvHD auf, die „progressive GvHD“, bei der ein direkter Übergang von der akuten in die chronische Form beobachtet wird und die „ruhende GvHD“, die nach Abklingen der aGvHD persistiert [112]. Die größten Risikofaktoren für eine cGvHD sind Patienten (Stammzellempfänger) im höheren Alter sowie diejenigen mit vorangegangener aGvHD [117]. Die klinische Manifestation der cGvHD ist ähnlich wie die einer Autoimmunerkrankung. Im Vergleich zur aGvHD sind wesentlich mehr Organe (Haut, Mund, Augen, Muskeln, weibliche Genitalien, Gi-Trakt, Leber, Lunge, Niere) betroffen, die im Verlauf relativ häufig fibrotisch werden [118].

#### **1.4.2.1 Pathophysiologie der cGvHD**

Die Pathophysiologie einer cGvHD ist weniger gut verstanden. Der oben beschriebene Mechanismus der aGvHD sowie viele weitere Faktoren sind in die Entwicklung einer cGvHD involviert. Hierzu zählen eine Thymus-Dysfunktion, Folge einer aGvHD [119], das Auftreten von Autoantikörpern im Zusammenhang mit einer Treg-Dysfunktion [120], B-Zell-Dysregulation [121] und allo- sowie autoreaktive T- und B-Lymphozyten [112].

Autoimmunerkrankungen und cGvHD zeigen ähnliche Symptome (Autoantikörperproduktion, systemisch Fibrose und Defekte in der Thymusfunktion). In beiden Fällen richtet sich das Immunsystem, durch chronische Stimulation, gegen bestimmte Organe/Zellen und schädigt sie, mit dem Unterschied, dass es sich bei cGvHD um miHAs handelt und bei Autoimmunerkrankung um nicht polymorphe Autoantigene [122]. Es ist noch nicht klar, ob es bei der cGvHD die gleichen oder unterschiedliche miHAs sind, die eine aGvHD auslösen [123].

## 2 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es *in vivo* T-Zellantworten zu charakterisieren und zwar in zwei unterschiedlichen Kontexten, einem pathophysiologischen, also einem unerwünschten, wie dem einer Abstoßungsreaktion. Zum anderen sollte im Rahmen einer Patienten-individuellen anti-Tumor-Peptid-Vakzinierung geklärt werden ob eine anti-tumorale Impfantwort im Patienten nachweisbar sei bzw. durch die Vakzine etabliert werden konnte. Dieser Teil der Arbeit basierte auf der Untersuchung der T-Zellantwort eines an Pankreaskarzinom erkrankten 62-jährigen Patienten nach Patienten-individueller Peptid-Vakzine.

Über NGS-Technologien wurden dem Patienten, nach kompletter Exomsequenzierung von Tumormaterial und gesundem Gewebe sowie nach *in silico* Identifikation Tumor-spezifischer Mutationen, synthetisierte Peptide, die die keimbahnverändernden Mutationen tragen, als Vakzine (Vier-Peptid-Impfstoff) mit einem Adjuvans verabreicht.

Die Impfung wurde während der Chemotherapie in der zweiten kompletten Remission begonnen und anschließend monatlich fortgesetzt. Die Analyse der IFN- $\gamma^+$  T-Zellantwort gegen die vier Impfstoff-Peptide erfolgte nach 12, 17 und 34 Impfungen. Zu jedem dieser Zeitpunkte sollte ein Immunmonitoring (IM) durchgeführt und untersucht werden,

- ob diese Patienten-individuelle anti-Tumor-Vakzinierung in der Lage ist eine T-Zellantwort gegen eines oder mehrere von diesen insgesamt vier Peptiden auszulösen,
- wie breit das Repertoire an TCRs ist, die die jeweiligen Peptide erkennen, d.h. wie breit/ divers die Immunantwort etabliert wurde,
- wie lange die anti-tumorale Impfpeptid-spezifische Antwort persistiert und
- welche Impfpeptide die stärkste Immunantwort hervorrufen.

Im Hinblick auf die Option zur Herstellung von Chimären-Antigen-Rezeptor tragender T-Zellen für den adoptiven Transfer in der anti-Tumor-Therapie sollten TCRs, impfreaktiver T-Zellen, vollständig charakterisiert und sequenziert werden, d.h. nach Etablierung Impfpeptid-reaktiver Klone und Expansion derselben sollten beide Komponenten des TCR Heterodimers, d.h. die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Kette identifiziert und sequenziert werden. Dieses Vorgehen wäre die Rationale für die Herstellung Patienten-spezifischer und Tumor-individueller CAR T-Zellen.

Für dieses immunologische Monitoring sollte dem Patienten Blut entnommen, daraus *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) isoliert, diese in Kultur genommen und mit den Peptiden gepulst werden. Im ersten Ansatz sollten die PBMCs in der Kurzzeitkultur, zur Anreicherung der Peptid-spezifischen T-Zellen, mit allen vier Peptiden gleichzeitig gepulst werden, im zweiten und dritten Ansatz jeweils mit den einzelnen Peptiden in Einzelansätzen.

T-Zellen sezernieren, wenn sie spezifisch, d.h. über den TCR stimuliert werden, IFN- $\gamma$  und können so über den IFN- $\gamma$  Catch Assay isoliert werden und mittels Durchflusszytometrie, molekulargenetischen Verfahren wie RNA-Isolation, cDNA-Synthese, RT-PCR, TCRV $\alpha$ - und TCRV $\beta$ -Repertoire Spektratypisierung sowie Sanger-Sequenzierung charakterisiert werden.

Der zweite Teil der Arbeit bezog sich auf die unerwünschten T-Zellantworten einer GvHD. Dafür wurden NSG-Mäuse untersucht, die nach Transplantation eines humanen CD3<sup>+</sup> T-Zell depletierten CD34<sup>+</sup> selektionierten Stammzellgrafts, im Laufe mehrerer Wochen den Phänotyp einer massiven cGvHD entwickelten mit Beteiligung multipler Organe. Dieser Phänotyp entwickelte sich bei 2 von 15 CD34<sup>+</sup> Stammzell-Spendern. Beide Spender hatten einen – interessanterweise unterschiedlichen – HLA- Haplotyp, jedoch zeichnen Träger dieser beider Haplotypen die Suszeptibilität für Rheumatoide Arthritis aus. Im Vordergrund stand die Frage:

- wird die Abstoßung von systemischen Klonen getrieben
- wie breit ist das alloreaktive TCR-Repertoire
- gibt es Organ-spezifische T-Zellkompartimente
- lässt sich anhand der Epitop-bindenden CDR3-TCR-Regionen eine potentiell ähnliche Reaktivität erkennen durch homologe bzw. identische Motive.

Für diese ausführliche Charakterisierung der T-Zellen einer cGvHD sollten die Organe nach dem Tod der Maus entnommen und histologisch sowie auf mRNA Ebene molekulargenetisch analysiert werden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Die folgende Abbildung 3 verdeutlicht wie breit das Wirkungsspektrum aktivierter  $\alpha\beta$ -T-Zellen ist und zeigt wie kontrovers die Wirkung in den unterschiedlichen Kontexten sein kann.

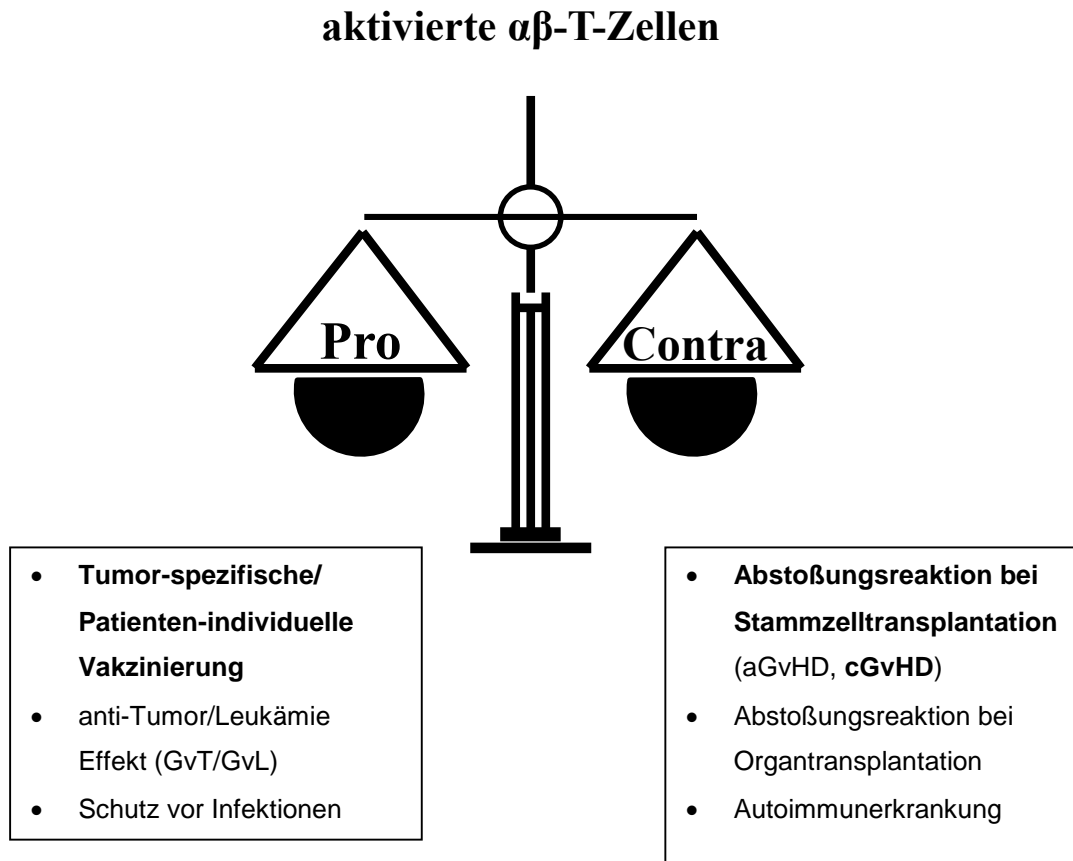


Abb.3: Vor-und Nachteile aktivierter  $\alpha\beta$ -T-Zellen, modifiziert nach Gress *et al.* [124]

### **3.1 Analyse und Funktionalität von $\alpha\beta$ -T-Zellen nach Patienten-individueller anti-Tumor-Vakzinierung**

#### **3.1.1 Bestimmung immunogener Impfpeptide und deren Wirkung auf die T-Zellen**

Eines der entscheidenden Merkmale einer T-Zell-abhängigen Immunreaktion ist der TCR, der das MHC-Molekül über die CDR1- und CDR2-Region und das Antigen über die CDR3-Region bindet. Aus diesem Grund muss bei der Bestimmung eines immunogenen anti-Tumor-Vakzins das Antigen, das die Tumor-spezifische oder Tumor-assoziierte Mutation trägt, auf die MHC-Restriktion des Patienten abgestimmt werden. Ansonsten besteht die Gefahr, dass das Antigen nicht präsentiert wird und die damit verbundene Immunreaktion ausbleibt.

Ein Tumor-spezifisches Antigen setzt zudem voraus, dass das Tumorgewebe bzw. die Metastase sich genetisch vom gesunden Referenzgewebe unterscheidet sonst besteht die Gefahr, dass sich die Immunreaktion auch gegen gesunde Körperzellen richten kann.

Im Fall unseres Patienten wurden zwei Missens-Mutationen, eine im RMI1 Protein p.[Met134Ile], (NM\_024945) und eine weitere im KIF4b Protein p.[Arg744Lys], (NM\_001099293) gefunden. KIF4B ist ein Mikrotubuli-basiertes Motorprotein, das eine wichtige Rolle in der Anaphase-Spindel-Dynamik und Zytokinese spielt und dessen Überexpression in hepatozellulärem Karzinom zu einer wesentlich schlechteren Gesamtüberlebenszeit führt [125]. RMI wurde dagegen noch nicht im Zusammenhang mit Krebs beschrieben.

Die relevanten Epitop-Bindungsvorhersagen für HLA-Klasse I basieren auf Algorithmen der Programme NetMHC [126, 127] und SYFPEITHI [128] und wurden auf den MHC des Patienten (HLA-A\*01:01, HLA-A\*02:01; HLA-B\*18:01, HLA-B\*44:02; HLA-C\*07:01, HLA-C\*05:41, HLA-DRB1\*11:01, HLA-DRB1\*13:01, HLA-DQB1\*03:01, HLA-DQB1\*06:03) abgestimmt. Für Peptid 1 und 3 wurde nur eine schwache und für Peptid 2 und 4 keine Bindung vorhergesagt. Aufgrund der wenigen Mutationen des Tumors und der geringen Auswahl an Peptiden wurden alle vier Peptide für den Impfstoff verwendet. Nach den ersten 12 Impfungen zeigten 1,6 % der T-Zellen des Patienten eine immunogene Reaktion.

Peptid 1 und 4 sowie 2 und 3 beinhalten dieselbe Missens-Mutation. Interessanterweise erzielten wir mit Peptid 1 (RMI) die stärkste und mit Peptid 2 (KIF4B) die zweitstärkste T-Zellantwort während die anderen beiden Peptide (3 und 4) so gut wie keine Antwort induzierten, korrelierend zur Bindungsvorhersage der jeweiligen Peptide. Dies bestätigt den großen Einfluss der HLA-Restriktion auf den Erfolg der T-Zellantwort. Die beste Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit den Bindungsvorhersagen erfolgte mit dem Algorithmus von SYFPEITHI, der einen Score berechnet, basierend auf den Übereinstimmungen der Ankerpositionen einer MHC-Tasche mit den entsprechenden Aminosäuren der Impfpeptide. Anhand dieser Vorhersage konkurrieren Peptid 1 und 3 sowie 2 und 4 um dieselbe HLA-Bindungstasche was letztendlich dazu führt, dass die bevorzugten Peptide 1 und 2, die jeweiligen anderen Peptide 3 und 4 aus der MHC-Bindung verdrängen. Damit wird deutlich warum Peptid 1 und 2 die stärkeren Immunantworten induzieren. Bei mehreren Mutationen/ Peptiden empfiehlt es sich, nur vier immunogene Peptide auszuwählen, da sie bei selber HLA-Restriktion um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren [129]. Im optimalen Fall sollten sie auch an getrennten Körperstellen injiziert werden [130].

### **3.1.2 Analyse der Impfstoff-reaktiven T-Zellpopulation nach Vakzinierung und *in vitro* Stimulation**

Der überwiegende Teil der im 1. IM identifizierten T-Zellen, die positiv auf die vier Impfpeptide reagierten waren nicht wie erwartet CD8<sup>+</sup>, sondern CD4<sup>+</sup> (67,5 %), ein geringerer Anteil CD8<sup>+</sup> (19,7 %) und 8,4 % der T-Zellen CD4<sup>-</sup> und CD8<sup>-</sup> (DN). In den folgenden Einzelansätzen des 2. IM fanden wir heraus, dass die IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen der doppelt negativen Population durch Peptid 1 stimuliert wurden, während Peptid 2 neben CD8<sup>+</sup> auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen stimulierte. Peptid 3 und 4 induzierten keine Immunreaktion, wie im oberen Abschnitt schon beschrieben. Basierend auf diesen Daten analysierten wir die Vorhersagen für MHC-Klasse II (NetMHC) mit dem Ergebnis, dass Peptid 2 auch an HLA-DRB1\*1101 und HLA-DRB1\*1301 schwach bindet und somit eine CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort induzieren kann.

Die 70 % der T-Zellen, die auf Peptid 1 reagieren, CD3<sup>+</sup> sind aber weder CD4 noch CD8 exprimieren, weisen sich damit als  $\gamma\delta$ -T-Zellen aus.  $\gamma\delta$ -T-Zellen können direkt auf Peptidantigene, unabhängig vom HLA-Molekül und vom Prozessierungsmechanismus, reagieren [131]. Ein Peptid, das eine bewiesene  $\gamma\delta$ -TCR-abhängige

Reaktion auslöst, ist z.B. ein vom Tetanustoxin abgeleitetes Peptid, das *Clostridium tetani*<sub>1235-1246</sub> [132] (GNAFNNLDRILR), dessen C-Terminus in drei Aminosäuren identisch ist mit dem C-Terminus von Peptid 1 (WEAKSPRIL). Dieses Motiv ist ausreichend für eine effektive  $\gamma\delta$ -TCR-Bindung und eine daraus resultierende Immunantwort [133]. Es ist durchaus legitim anzunehmen, dass die DN T-Zellen, die im 1. und 2. IM auf Peptid 1 reagierten,  $\gamma\delta$ -T-Zellen sind.

Im 3. IM konnten mit Peptid 1 und 2 T-Zellklone generiert werden, die alle den Rezeptor CD4<sup>+</sup> exprimierten. Bei diesen Klonen handelt es sich um zytotoxische CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die CRTAM exprimieren, ein Protein, das für die Induktion von CTLs erforderlich ist [134]. CRTAM<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen besitzen Eigenschaften von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sekretieren IFN- $\gamma$  und zeichnen sich durch die Fähigkeit aus CTL-typische Proteine, wie Granzyme B und Perforin, zu sekretieren. Sie gelangen zum Entzündungsort [134] wo sie aufgrund ihrer CTL-typischen Proteine die Zielzelle, in diesem Fall die Tumorzelle, abtöten können. Obwohl CD4<sup>+</sup> CTLs einst als *in-vitro* Artefakt angesehen wurden, konnte sie mittlerweile *in vivo* identifiziert werden und spielen seitdem eine wichtige Rolle bei der antiviralen und anti-Tumor-Immunität sowie bei Entzündungen [135].

### **3.1.3 T-Zellrepertoire der immunreaktiven T-Zellen nach Vakzinierung und nach *in vitro* Stimulation**

Ein wesentlicher Vorteil für eine erfolgreiche Impfung ist ein gesundes Immunsystem und ein breites T-Zellrepertoire. Jedoch reduziert eine starke Chemotherapie nicht nur die Anzahl der Tumorzellen sondern auch die der Immunzellen und damit auch die T-Zellantwort. In diesem Patienten konnten wir die Folgen der Chemotherapie aufgrund der geringen Diversität des  $\alpha\beta$ -T-Zellrepertoires zu Beginn der Impfung erkennen. Nach insgesamt 34 Impfungen und dem Absetzen der Chemotherapie erholten sich die T-Zellen und die Diversität des  $\alpha\beta$ -T-Zellrepertoires nahm wieder zu. Die verstärkte klonale Expansion der T-Zellen des Patienten deutet auf eine erhöhte T-Zellproliferation monoklonaler TCRs hin, die nach Antigenkontakt z.B. nach einer akuten Infektion oder Impfung zu erwarten ist. Die Sequenzierung der einzelnen Peaks ergaben CDR3-Motive, die bei CMV-Infektion oder Mykobakterieninfektion bekannt sind. Zum Zeitpunkt der Untersuchung hatte der Patient weder eine CMV- noch eine Mykobakterien-Infektion. Möglicherweise hatte er eine solche Infektion in der



Vergangenheit gehabt und daraufhin Gedächtnis-T-Zellen gebildet, die durch die Impfung oder durch die Chemotherapie stark restimuliert wurden [136].

### **3.1.4 Analyse der CDR3-Region immunreaktiver T-Zellen**

Eine genauere Aussage über die T-Zell-spezifische Antigenerkennung dieser reaktiven T-Zellen ist durch die Analyse der hypervariablen CDR3-Region klonaler TCRs möglich. Sie ist zusätzlich an der Rekrutierung von T-Zellklonen beteiligt, die an der immunologischen Reaktion mitwirken.

Die CDR3-Region der  $\alpha\beta$ -Ketten des Impfstoff-spezifischen TCR-Repertoires persistierte über den Zeitraum von 3 und 15 Monaten. Diese anhaltende, Peptid-spezifische Immunität belegen die überwiegend positiv geladenen CDR3-Sequenzen der  $\alpha$ -Ketten, zwei identische TCRs und zwei konvergente CDR3-Sequenzen der immunreaktiven T-Zellen an unterschiedlichen Zeitpunkten. Jeweils ein identischer und ein konvergenter TCR wurden von Peptid 2, ein stark immunogen wirkendes Peptid, stimuliert. Zudem induzierte Peptid 2 ein breites T-Zellrepertoire, wahrscheinlich bedingt durch die Variation an Präsentationsmöglichkeiten über HLA-Klasse I (HLA-A\*02 [128]), HLA-Klasse II (HLA-DRB1\*11:01, HLA-DRB1\*13:01 [137]) und CD1d [138], die alle für dieses Peptid 2 eine Bindung vorhersagen.

Die Präsentation über CD1d erfolgte über hydrophobe Aminosäuren, ausschlaggebend sind dabei die Ankerpositionen 1- - 4 - -7, Positionen die Peptid 2 mit den entsprechenden hydrophoben Aminosäuren aufweist.

Peptid 1 erwies sich ebenfalls als besonders immunogen, mit diesem Antigen konnten konvergente CDR3-Regionen über 15 Monate nachgewiesen werden. Zudem wurden mit diesem Peptid die meisten Klone restimuliert und Klone mit dualen TCRs identifiziert (3 TCR Ketten). Duale T-Zellen haben die Besonderheit, dass sie das Immunrepertoire für fremde Antigene erweitern, was ein großer Vorteil für das Immunsystem sein kann. Anders als bei einzelnen TCRs, nutzen duale TCRs den nicht selektiven TCR um in der Peripherie auf fremde Antigene zu reagieren wobei die Koexpression des zweiten TCRs die intrathymische Selektion ermöglicht [139].

### **3.1.5 Zelluläre und molekulare Charakterisierung Impfstoff-reaktiver T-Zellen**

Aktivierte T-Zellen sind die Grundlage für eine Immuneffektorfunktion. Typische Aktivierungsmarker wie CD25, CD69 und HLA-DR konnten wir in sehr hohen Konzentrationen auf den Impfstoff-spezifischen Klonen nachweisen und legen eine Immunantwort auf die Tumor-spezifischen Antigene (Peptide) nahe.

Das Ziel der Impfung sind auf den Tumor geprimte T-Zellen mit Gedächtnisfunktion. Die Oberflächenmarker, die den Differenzierungszustand der T-Zellen beschreiben, ergaben für die Impfstoff-reaktiven Klone des Patienten, die mit den Peptiden geprimt wurden, den Phänotyp einer terminal differenzierten Effektor-T-Zelle (TEMRA: CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>) [140]. Dieser Phänotyp bestärkt das Ergebnis einer erfolgreichen Impfung [141]. Im Gegensatz dazu, entwickelten die Klone der Kontrolle, einen Effektor-Gedächtnis-Phänotyp (CD45RO<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>, CD62L<sup>-</sup>, CCR7<sup>-</sup>, CD27<sup>-</sup>).

### **3.1.6 Wissenschaftlicher Standpunkt und Perspektive der Patienten-individuellen Vakzinierung**

Eine anti-Tumor-Vakzinierungstherapie setzt ein intaktes Immunsystem voraus, das nach intensiver Chemotherapie nicht immer vorhanden ist. Um Synergien herzustellen besteht die Möglichkeit die Chemotherapie so zu nutzen, dass sie das Immunsystem nicht nur schädigt, sondern andererseits auch aktiviert. Die Substanzen, die dies vermögen werden als ICD Inducer bezeichnet, dazu gehört die Kombination mit Chemotherapie wie FOLFERINOX [66].

Das immunogene Potenzial von ICD beruht auf den immunstimulatorischen Eigenschaften der DAMP (*Damage-Associated Molecular Pattern*), die diese Form der Apoptose charakterisieren. Insbesondere sind die Moleküle, die während der späten Stadien der ICD von absterbenden Zellen sekretiert werden, in der Lage, DC direkt zu binden und zu aktivieren oder Immunzellen in die Tumormikroumgebung zu locken [142]. Während und nach der ICD-Induktion fördern inflammatorische Zytokine, die erhöhte MHC-Klasse-I-Expression auf APCs, die T-Zell-Differenzierung und die Aktivierung der NK-Zelle, diesen Prozess [143].

Die Kombination aus ICD und individueller anti-Tumor-Vakzinierung könnte für einen langfristigen Erfolg sorgen.

Eine große Rolle bei jeder Immunantwort spielt der aktivierte induzierte Zelltod der Immunzellen, AICD (activation-induced cell death) der über CD95 und CD95 Ligand (CD95L) induziert wird und in erster Linie dazu dient, die Anzahl der reaktiven T-Zellen zu reduzieren und die Immunantwort zu beenden. Dabei gibt es drei verschiedene Wege die physiologische Apoptose von peripheren T-Zellen einzuleiten [144].

Die erste Möglichkeit ist die periphere Deletion aktivierter reifer T-Zellen am Ende der Immunantwort. Während der Phase der klonalen Expansion sind die T-Zellen resistent gegenüber diversen apoptotischen Stimuli. Erst mit Erreichen des Höhenpunktes der Immunreaktion treten die Zellen in die sogenannte Deletionsphase, in der sie Apoptose sensitiv werden und infolge einer erneuten Stimulation des T-Zellrezeptors, die Expression des CD95L induzieren. Neben dem CD95L exprimieren T-Zellen auch CD95 d.h. es kommt zu Apoptose durch Fratrizid oder auch zu autokrinem Suizid [145]. Gleichzeitig verstärkt die IL-2 Expression der T-Zellen deren Induktion zum AICD [146].

Die zweite Möglichkeit betrifft die zytotoxischen T-Zellen und NKT-Zellen, die virusinfizierten Zellen oder Krebszellen abtöten. Denn stark aktivierte T-Zellen oder eine verminderte Reaktion der Tumorzellen auf die CD95 Stimulation scheinen die anti-Tumor-Immunantwort zu beeinträchtigen und eher ein Wachstum dieser Zellen zu fördern. Im schlimmsten Fall können die Tumorzellen mittels einer *de-novo* Expression von CD95L, die CD95<sup>+</sup>-anti-Tumor-Lymphozyten eliminieren [147]. Die dritte Möglichkeit, spielt in dieser Arbeit eher eine untergeordnete Rolle, ist das Abtöten von Immunzellen an „immunprivilegierten“ Stellen, wie z.B. am Auge [144].

Das Ziel einer Patienten-individualisierten Peptid-Vakzinierung ist eine langanhaltende Immunantwort. Mit Hilfe der anti-apoptotischen Wirkungen von IL-15 als zusätzlicher Bestandteil des Impfstoffes könnte die IL-2-vermittelte AICD gehemmt [148], eine frühe AICD verhindert und die Immunantwort lange aufrecht gehalten werden.

Ein weiterer Punkt, um die Kontrollmechanismen des Immunsystems zu umgehen und die Immunreaktion auf das Tumorgewebe zu triggern und zu stärken ist die zusätzliche Gabe von Checkpoint-Inhibitoren zu den Peptid-Vakzinen. Die alleinige Anwendung von Checkpoint-Inhibitoren erzielte bisher bei Patienten mit Pankreaskarzinom keine Erfolge aber in Kombination mit  $\alpha$ CD40/Chemotherapie [149] und möglicherweise mit Patienten-individualisierten Vakzinen.

Im Hinblick auf eine Etablierung dieser Therapieform als Standardtherapie muss bedacht werden, dass diese Kombinationstherapie kostenintensiv und zeitaufwendig

in der Herstellung ist. Ein Patienten-individueller Impfstoff kann aufgrund der Individualität nicht in großen Dimensionen produziert werden und muss für jeden Patienten und Tumor neu analysiert, entwickelt und hergestellt werden. Einen Flaschenhals bildet dafür mit Sicherheit die datentechnische Verarbeitung und Analyse sowie die Peptidsynthese.

Impfstoffe, die Peptide mit bekannten Mutationen beinhalten, wie Melan-A/ MART-1 [150] oder sich auf ein Protein wie K-ras beschränken, das z.B. bei Pankreaskarzinom häufig mutiert ist [95], sind weniger aufwendig, beschränken sich aber gleichzeitig auf eine kleinere Gruppe an Patienten.

Für Patienten mit individuellen Mutationen besteht die Hoffnung, dass sich aufgrund der rasanten Entwicklung, die lange Wartezeit und die hohen Kosten der Analyse der Exomsequenzierung reduzieren und diese Form der Therapie möglicherweise bald routinemäßig angewandt wird. Allerdings ist nicht die Sequenzierung an sich kostspielig, sondern der datentechnisch hohe Aufwand beim Abgleich der Exombanken von Tumorgewebe *versus* dem gesunden Gewebe, sowie die Vorhersage der Peptide für die Patienten-spezifischen HLA-Liganden.

Ein wichtiges Argument für die Patienten-individuelle Vakzinierung ist, dass die Peptid-Impfung für den Patienten, neben den allgemein bekannten minimalen Nebenwirkungen einer Impfung, keine wirklich schwerwiegenden Konsequenzen hat wie viele andere Tumorthapien und allein durch die geringe Toxizität überzeugt. Zudem konnten wir zeigen, dass dieser Impfstoff in dem Patienten eine Immunreaktion bewirkte und trotz schlechter Prognose dieser Patient 5 Jahre ohne Rezidiv blieb. Interessanterweise erlitt der Patient im Jahr 6 nach Exomsequenzierung und Impfung ein Rezidiv, dieses zeigte jedoch keine, der seinerzeit identifizierten Mutationen! Man kann damit davon ausgehen, dass das Immunsystem über die Mutations-spezifischen Impfpeptide aktiviert wird und Tumorzellen mit dieser Mutation eradiziert werden, jedoch Tumorzellen, die nicht diese Mutation, sondern höchstwahrscheinlich Neumutation tragen, verschont bleiben.

Nach diesem Tumorediting erhält der Patient jetzt neue Vakzine gemäß den jetzt festgestellten aberranten Tumorproteinen.

## 3.2 Analyse und Funktionalität von alloreaktiven $\alpha\beta$ -T-Zellen der cGvHD

### 3.2.1 Entstehung alloreaktiver T-Zellen nach T-Zell-depletierter HSCT in

#### NSG-Mäusen

Bei einer Stammzelltransplantation ist ein ausschlaggebendes Kriterium für die Entwicklung einer GvHD das Engraftment. In den meisten Fällen korrelieren beide Faktoren miteinander, belegt durch unsere Daten, die zeigen, dass in den CD34<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> transplantierten Mäusen die Engraftmentrate bei den an cGvHD erkrankten Mäusen signifikant höher ist, im Vergleich zu den pathologisch unauffälligen Mäusen analog zum Prozentsatz der nachgewiesenen T-Zellen. Das Engraftment ist essenziell für die Wiederherstellung eines funktionellen Immunsystems im Empfänger. Während bei einer Transplantation mit CD3<sup>+</sup> Zellen, wie z.B. bei identischer HLA-Transplantation, die T-Zellen über extrathymische T-Lymphozytenreifung frühzeitig nach HSCT expandieren, entwickeln sich die CD34<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup> T-Zellenprogenitoren im Thymus erst nach drei bis vier Monaten zu reifen T-Zellen [151]. Dieser Reifungsprozess, der transplantierten CD34<sup>+</sup> humanen Stammzellen zu funktionellen T-Zellen erfolgte in dieser Arbeit in NSG-Mäusen im chimären Thymus, der aus Mausfibroblasten und humanen myeloiden Vorläuferzellen bestand.

Im Thymuscortex durchlaufen die dreifach negativen (CD3<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>) CD34<sup>+</sup> transplantierten Zellen unter physiologischen Bedingungen eine Expansion von 8 bis 9 Zellteilungen [152]. Die kortikalen Thymusepithelzellen (cTEC) und die Stromazellen exprimieren im physiologisch vorhandenen normalen Thymus eine Reihe von Signalen für die Entwicklung der T-lymphoiden Stammzellen. Die Positivselektion, der gereiften, doppelt positiven T-Zellen, die CD4 und CD8 auf ihrer Oberfläche exprimieren, dient der Erkennung und Bindung der MHC-Moleküle und ihrer Differenzierung in CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die anschließende Negativselektion ist essenziell für die Entwicklung der zentralen Toleranz gegenüber peripherem Gewebe. Diese ektopische Expression Gewebe-spezifischer Autoantigene erfolgt im Thymus durch medulläre Thymusepithelzellen (mTEC), die die Eigenschaft der professionellen APCs, Antigene zu präsentieren, besitzen [153]. Im chimär-artifiziellen Thymoid der humanisierten NSG-Maus erfolgte die Präsentation endogener Antigene über murine Fibroblasten sowie humane DCs [154], die im Thymus aus humanen CD34<sup>+</sup> Zellen differenzieren [155].

Binden die T-Zellen in diesem Selektionsschritt zu stark an den Peptid-beladenen MHC-Rezeptor, induziert diese Wechselwirkung, intrazelluläre Signale, die zum programmierten Zelltod führen und damit zur Eliminierung selbstreaktiver und möglicherweise schädlicher T-Zellen. Die reifen T-Zellen gelangen anschließend in die Peripherie, wo sie auf Antigene treffen, proliferieren und den Empfänger vor Infektionen schützen oder entartete Zellen bekämpfen.

Zusammengefasst heißt das, humane CD34<sup>+</sup> Zellen können sich in einer NSG-Maus ohne humanen Thymus zu T-Zellen mit einem polyklonalen  $\alpha\beta$ -T-Zellrepertoire entwickeln [156-158]. Die T-Zellen, die den NSG-Maus Thymus verlassen, haben die Fähigkeit eigene, also Maus-spezifische Minorantigene, sowie humane Epitope, die über den murinen oder humanen MHC präsentiert werden zu erkennen und sind somit tolerant gegenüber humanen und / oder murinen Peptiden/Geweben.

Trotzdem entwickelten 30 von 71 CD34<sup>+</sup> NSG-Mäusen der Kohorte I (*D1: HLA-A\*03:01, HLA-A\*03:01, HLA-B\*07:02, HLA-B\*57:01, HLA-Cw\*06:02, HLA-Cw\*07:02, HLA-DRB1\*07:01, HLA-DRB1\*15:01, HLA-DQB1\*03:03, HLA-DQB1\*06:02*) 24 Wochen nach Transplantation und 3 von 35 CD34<sup>+</sup> NSG-Mäusen der Kohorte II (*D2: HLA-A\*02x, HLA-A\*32x, HLA-B\*14x, HLA-B\*40:01, HLA-Cw\*03x, HLA-Cw\*08x, HLA-DRB1\*01:02, HLA-DRB1\*03:01, HLA-DQB1\*05:01, HLA-DQB1\*05:02*) 28 Wochen nach Transplantation ein T-Zellrepertoire, das gegen murine Peptide reagierte und folglich eine cGvHD induzierte, die sich pathologisch durch eine massive Sklerodermie der Haut äußerte. Es ist durchaus möglich, dass autoreaktive Lymphozyten des Spenders der Negativselektion entkommen und eine cGvHD induzieren [159, 160], die sich symptomatisch durch systemische Autoimmunerkrankung äußert [161]. Zudem konnten wir den Transkriptionsfaktor AIRE nicht nachweisen, der von cTECs und mTECs transkribiert wird, für die Eliminierung autoreaktiver TCRs zuständig ist [162] und bei GvHD vermindert exprimiert wird [162, 163]. Die ineffiziente Thymusselektion wäre eine Erklärung für die 30 Mäuse der ersten Kohorte bzw. 3 Mäuse der zweiten Kohorte die eine cGvHD bekamen. Dies erklärt aber nicht warum nur 42 % bzw. 9 % der Tiere betroffen waren und warum die 13 anderen HLA-Transplantate keine cGvHD induziert haben. Der einzige Faktor der die beiden Transplantate von den anderen 13 unterscheidet ist ihr HLA-Haplotyp.

Es wird viel darüber diskutiert wie wichtig der HLA-Haplotyp für die Entstehung einer cGvHD ist besonders aufgrund der Problematik einen HLA-identischen Spender für Patienten zu finden. Die derzeitigen Studien zeigen, dass eher die Varianten der

einzelnen Allele und minorHAs eine cGvHD verursachen. Das bedeutet, die Präsentation verschiedener Peptidrepertoires scheint wichtiger zu sein als die Unterschiede in der T-Zellerkennungssequenz des HLA-Moleküls.

Trotzdem kann das Risiko, ein cGvHD zu bekommen, durch die Transplantation verwandter Stammzellen, mit wesentlich höherer Übereinstimmung der Allele, im Vergleich zu nicht verwandten Stammzellen von 50 % auf nur 40 % gesenkt werden [164]. Das heißt, identische HLAs und minorHAs, die zwischen Spender und Empfänger, unter Verwandten eine höhere Übereinstimmung haben, können das GvHD Risiko nur minimal senken. Lediglich eine Transplantation mit identischen Zwillingen reduziert das GvHD Risiko drastisch, erhöht aber gleichzeitig das Rezidivrisiko. Interessanterweise ist das Leukämie-freie Überleben nach einer Transplantation bei Zwillingen genauso groß wie bei Geschwistern, da die erhöhte Rückfallrate bei Zwillingen mit der geringen Mortalität durch Therapiefolgen wie GvHD ausgeglichen wird [165, 166]. Das optimale Verfahren, bei dem das Transplantat in jedem Patienten eine GvT aber keine oder nur eine schwache GvHD induziert fehlt bis heute und verdeutlicht wie dringend Modellsysteme sind, um diese, für verschiedene Erkrankungen, notwendige Therapie zu optimieren und um den genauen Pathomechanismus der cGvHD zu verstehen.

### **3.2.2 Analyse der cGvHD verursachenden T-Zellpopulation und deren phänotypische Auswirkung**

In den Organen der von massiver Sklerodermie betroffenen Mäusen wie der Haut, Leber, Niere und Lunge, ausgeschlossen Dünndarm und Dickdarm, dominierte die lymphozytäre Infiltration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen analog zu humaner cGvHD und Autoimmunerkrankung [167, 168]. Eine Fibrose entwickelte sich dagegen nur in der Lunge und der Leber. Die Leber weist die stärkste histologische Veränderung auf mit granulomatöser Läsionen. Eine solche Hepatitis präsentierte sich ähnlich wie eine fulminante Autoimmunhepatitis beim Menschen. Zudem entwickelten die betroffenen Mäuse eine Alopezie und Sklerodermie, die durch Vernarbungen der Dermis und entzündliche Infiltrate gekennzeichnet war. Auch dieser Befund passt exakt zum komplexen Bild der cGvHD des Menschen, in der späteren Phase.

Die gesamten Ergebnisse beweisen, dass die cGvHD der CD34<sup>+</sup> NSG-Mäuse der humanen „*de novo*“ cGvHD (ohne vorangegangene aGvHD) stark ähnelt und zwar angefangen beim Transplantationstyp, die Erkrankung tritt bei Empfängern mit T-Zell-

depletierten Transplantaten auf [169], analog zum Krankheitsbeginn, sie beginnt sehr spät (sechs Monate nach der Transplantation) und ihrer Komplexität, sie zeigt, dass komplexe klinische Spektrum der Pleiotropie, die beim Menschen Darm, Lunge, Leber, Speicheldrüsen, Augen, Mundschleimhaut, Muskeln, Sehnen und Nerven betreffen kann. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen dominieren in Hautläsionen [167, 168] mit einer 100-fach höheren Infiltrationsrate im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wie wir bestätigen können. Zudem konnten wir zeigen, dass die wichtigsten pro-fibrotischen Mediatoren IL-13 und IL-4, die sich mit den anti-fibrotischen T<sub>H1</sub>-Zytokinen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  in Balance halten, verstärkt exprimiert werden.

### 3.2.3 T-Zellrepertoire der allogenen T-Zellen

Die Analyse des T-Zellrepertoires erfolgte in den unterschiedlichen cGvHD betroffenen Organen (Knochenmark, Haut, Milz und Lunge). Das T-Zellrepertoire zeigte in diesen Organen ebenfalls eine geringe Diversität was durch ein stark verändertes Gaußsches-Muster mit nur einzelnen Peaks zu erkennen ist. Die einzelnen Peaks spiegeln ein stark amplifiziertes T-Zellrezeptorrepertoire wieder, gekennzeichnet durch einzelne allogene T-Zellklone, die eine cGvHD initiieren und intensivieren [170].

### 3.2.4 Analyse der CDR3-Region allogener T-Zellen

Die verstärkt exprimierten TCRs der T-Zellen, aus der an cGvHD erkrankten Lunge und Haut, die bei der Spektratypisierung durch dominierte Einzelpeaks zu erkennen sind, verdeutlichen die Aktivierung durch spezifische, in der Peripherie verstärkt vorkommende Antigene. Diese klonal expandierten alloreaktiven T-Zellen zeigen autoimmune TCRs, gekennzeichnet durch Keimbahn-kodierte TCRs der CDR3-Region der  $\alpha$ -Ketten sowie durch hydrophobe Motive der CDR3-Regionen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten [171-173]. Der Nachweis mehrerer intra- und interindividuell konvergenter TCRs lässt auf verstärkt erkannte, gleiche oder ähnliche Epitope schließen. Direkte CDR3-Sequenzen, die als „*public motifs*“ für autoimmune oder alloreaktive TCRs bekannt sind, konnten wir in diesem Modell nicht finden aber CDR3-Regionen die schon im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankung, GvHD oder HSCT publiziert wurden. Das V $\beta$ -CDR3-Motiv „GLAG“ ist bekannt für aGvHD in der Haut [171], das CDR3-Motiv „LxG“ hat große Ähnlichkeit zu den CDR3-Regionen von TCRs aus der Haut, SLE (systemischer Lupus erythematodes) erkrankter Patienten [174] und die V $\delta$ 3-CDR3-Sequenz der Maus 130, die in 6 Aminosäuren



identisch ist mit der CDR3-Region, die in einem Patienten, 19 Monate nach haploidentischer Stammzelltransplantation identifiziert wurde [175]. Interessanterweise sind in der Spektralanalyse der  $\gamma\delta$ -TCRs, bei zwei der drei Mäusen (N130, N190), oligoklonal exprimierte V $\delta$ 1-TCRs zu erkennen, wie bereits bei Patienten mit systemischer Sklerose (Sklerodermie) beschrieben wurde [176]. Jedoch gibt es in der Maus keine Liganden für humane  $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptoren. Die  $\gamma\delta$ -T-Zellen schienen auf ein spezifisches, dominierendes, aus dem weiter oben genannten Grund, offensichtlich humanes Antigen zu reagieren, da in allen Individuen CDR3-Sequenzen mit dem WGI-Motiv entweder im V $\delta$ 1- oder V $\delta$ 3-TCR nachgewiesen wurden. Die gesamte Analyse des humanen  $\alpha\beta$ - und  $\gamma\delta$ -TCR-Repertoires der transplantierten und phänotypisch an cGvHD erkrankten Mäuse, weisen autoimmune Spezifitäten auf.

### 3.2.5 Zelluläre und molekulare Charakterisierung allogener T-Zellen

Aktivierte T-Zellen sind Verursacher der Abstoßungsreaktion nach HSCT. Die Analyse der T-Zellen von cGvHD betroffenem Gewebe bezüglich der Aktivierungsmarker, beschränkte sich auf die molekulare Analyse des CD40L, der besonders auf aktivierte CD4 T-Zellen [177] in der Lunge exprimiert wird und eine große Rolle bei der Erzeugung von Plasmazellen mit Autoimmunitätsspezifität spielt [177]. Die Entstehung alloreaktiver Gedächtnis-T-Zellen gegen miHAs erfordert die dauerhafte Stimulation der T-Zellen mit miHAs des Wirts. Diese alloreaktiven Gedächtnis- aber auch Effektor-T-Zellen sind für die anhaltende Schädigung des Wirtsgewebes verantwortlich [178].

Die weiteren Analysen der alloreaktiven T-Zellen bezogen sich auf molekulare Marker der  $T_{H1}$ - und  $T_{H2}$ - Immunantwort. Die T-Zellen exprimierten verstärkt den Transkriptionsfaktor GATA3 und pro-fibrotisches TGF- $\beta$  und IL-13, das auf ein  $T_{H2}$ -ausgerichtetes CD4 Kompartiment hindeutet. Die  $T_{H1}$ -assoziierten Marker T-bet und IFN- $\gamma$  wurden dagegen weniger stark transkribiert. Eine Ausnahme macht TNF $\alpha$ , das verstärkt in der Lunge vorkam. TNF $\alpha$  tritt oft schon vor Beginn der cGvHD auf und könnte auf einen Defekt immunregulatorischer Zellen hindeuten [179]. Die  $T_{H2}$ -Zytokin Dominanz legt nahe, dass sich die cGvHD bereits im fortgeschrittenen Krankheitsprozess befand, da  $T_{H1}$ -Zytokine hauptsächlich an der Initiierung und / oder Aufrechterhaltung der cGvHD beteiligt sind [180].

### 3.2.6 Assoziation zwischen Patienten-individuellem MHC: Auftreten von Autoimmunerkrankung und GvHD

Der HLA-Typ des Transplantats der Kohorte I und II weist einen Haplotyp auf, der mit einer erhöhten Anfälligkeit bezüglich Autoimmunerkrankungen assoziiert sind.

Der Haplotyp HLA-Cw\*06:02- HLA-DRB1\*07:01-HLA-DQB1\*03:03, übereinstimmend mit dem Transplantat der Kohorte I wird mit Psoriasis und schwerer Alopecia Areata [181-183] assoziiert. Ebenso ist der Haplotyp HLA-Cw\*08:02-HLA-DRB1\*01:02-DQB1\*05:01, der mit dem Transplantat der Kohorte II übereinstimmt mit Typ-I-Psoriasis und rheumatoider Arthritis assoziiert [184]. Diese Daten zeigen zwei humane für Autoimmunität anfällige HLA-Haplotypen (HASEH, engl.: *human autoimmunity susceptibility extended HLA-haplotypes*) [185], die sich in allen Allelen unterscheiden und dennoch beide dafür bekannt sind, anfällig für systemische Sklerodermie GvHD in CD34<sup>+</sup>-NSG-Mäusen zu sein.

Ein signifikanter Anstieg des GvHD Risikos wurde auch für verschiedene menschliche HLA-Klasse-I-Allele in BLT-Mäusen (HLA-A\*11:01, HLA-A\*24:02, HLA-A\*33:03, HLA-A\*02:01, HLA-B\*13:02, HLA-B\*35:02, HLA-Cw\*06:02, HLA-Cw\*04:01) nachgewiesen, während andere HLA-Klasse-I-Moleküle (HLA-A\*32:01, HLA-B\*08:01, HLA-B\*14:01) eher eine signifikante Schutzwirkung haben [186]. Das Transplantat der Kohorte II exprimiert zwei Allele der HLA-Klasse-I (HLA-B\*14:01, HLA-A\*32:01), die in der BLT-Maus eine Schutzwirkung zeigt [186] und verursachte in 33 % der Fälle weniger cGvHD als das Transplantat der Kohorte I. Übereinstimmend mit dem protektivem Allel traten die ersten Symptome in Kohorte II protrahiert auf, d.h. 4 Wochen später als in Kohorte I, der ein protektives Allel fehlte. Insgesamt wurden 15 Transplantate überprüft. In den 13 weiteren Kohorten, von Rezipienten HLA-typisierter CD34<sup>+</sup>-Transplantate, zur Humanisierung von NSG-Kohorten, zeigte keiner der Mäuse autoimmune Phänomene, obwohl die Transplantate von Spendern stammten, die mindestens jeweils 1 oder 2 HLA-Allele exprimierten und die mit Autoimmunerkrankung in Verbindung gebracht werden. Dies unterstreicht die kritisch zu betrachtende Assoziation zwischen dem MHC und verschiedener Erkrankungen wie GvHD bzw. Autoimmunerkrankung.

## 4 Fazit

Beide Studien demonstrieren das Potenzial aktivierter T-Zellen!

Die gezielte, Tumor-spezifische Stimulation Patienten-eigener T-Zellen in Form einer Peptidimpfung, optimiert die Immunreaktion gegen Tumorzellen und ermöglicht bei beständiger metronomischer Vakzinierung eine langfristige und nebenwirkungsarme Bekämpfung des Tumors!

Das entscheidende bei dieser Therapie ist das Immunmonitoring nach Vakzinierung. Nur die detaillierte Immunüberwachung deckt funktionelle und molekulare Aspekte der T-Zellbiologie ab und ermöglicht das Ansprechen von Krebs-Impfstoffen zu erkennen. Die Identifikation der Peptid-reaktiven T-Zellen, innerhalb des komplexen Repertoires bestehender TCR-Sequenzen, etablierter Immunität und naiver T-Zellen, eines jeden menschlichen Individuums bleibt eine große Herausforderung. NGS kann neben der Analyse der Tumor-spezifischen Mutation inzwischen zusätzlich methodische Abläufe ersetzen und beschleunigen, wie die Sequenzierung bekannter hypervariabler Regionen eines TCR oder die Abschätzung der aktuellen Häufigkeit und Redundanz eines T-Zell-Klons. Jedoch für die Analyse der Impfstoff-spezifischen T-Zellantwort bzw. für die Charakterisierung der Diversität des  $\alpha\beta$ -TCR-Repertoires, die Erkennung der Korrelation der identifizierten TCR-Sequenzen und ihrer Spezifität, benötigt es die entsprechende Expertise und ein komplexes Methodenspektrum.

Diese therapeutische Impfung mit einem Neoantigen-abgeleiteten Vier-Peptid-Impfstoffes führte zu einer vielfältigen und langanhaltenden Immunantwort gegen den Tumor mit einer langen klinischen Remission und sollte aufgrund der guten Daten, der sehr vielen Anfragen von Ärzten und Patienten sowie der geringen Nebenwirkung in einer weiterführenden und größeren klinischen *Proof-of-Concept*-Studie fortgeführt werden.

T-Zellen mit autoreaktiven Eigenschaften demonstrieren das negative Potenzial aktivierter T-Zellen. Theoretisch gehen T-Zellen mit autoreaktiven Eigenschaften noch im Thymus in die Apoptose. Dieser Prozess der zentralen Toleranz verhindert die Freisetzung autoimmuner T-Zellen in die Peripherie. Autoreaktive T-Zellen, die dennoch in die Peripherie gelangen, werden zusätzlich durch Anergie, „*death by Neglect*“ oder aktive Unterdrückung durch Tregs unschädlich gemacht [187]. Zudem können sich autoreaktive T-Zellen aber auch erst in der Peripherie entwickeln,

beispielsweise als Folge von Bystander-Aktivierung, von sogenanntem „Epitop spreading“, von molekularer Mimikry [188] oder infolge einer Transplantation, die zur GvHD führen kann. Um den Prozess der autoreaktiven T-Zellen, wie sie bei Autoimmunerkrankungen oder bei einer GvHD auftreten, genauer zu verstehen, beschrieben und etablierten wir das erste Mausmodell, das die komplexe chronische Abstoßung in ihrer Pathophysiologie darstellt: Es stimmt in 5/5 Punkten mit den Kriterien einer humanen cGvHD überein [185]:

- 1) Inzidenz bei Empfängern von T-Zell depletierten Transplantaten
- 2) verzögerter Beginn der Krankheit (6 Monate nach Transplantation)
- 3) Reproduktion eines komplexen klinischen Spektrums der Pleiotropie, die beim Menschen Darm, Lunge, Leber, Speicheldrüsen, Augen, Mundschleimhaut, Muskeln, Sehnen und Nerven betreffen kann
- 4) Dominanz der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Hautläsion mit einer 100fachen Infiltrationsrate im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen
- 5) verstärkte Expression der wichtigsten pro-fibrotischen Mediatoren IL-13 und IL-4, die sich mit den anti-fibrotischen T<sub>H1</sub> Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  die Balance im Gewebe halten.

Dieses erste und neue *in vivo* Modell der CD34<sup>+</sup> NSG-Maus, alleine oder mit Hilfe komparativer Analysen anderer Modelle wie dem der BLT NSG-Maus, ermöglicht die komplexen Pathomechanismen einer GvHD oder Autoimmunerkrankung aufzuklären und neue Konzepte für die Prävention und Behandlung von Autoimmunerkrankungen zu evaluieren.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Eibel, H., et al., *B cell biology: an overview*. Curr Allergy Asthma Rep, 2014. **14**(5): p. 434.
2. Liu, Y.J., et al., *Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens*. Eur J Immunol, 1991. **21**(12): p. 2951-62.
3. Konig, R., L.Y. Huang, and R.N. Germain, *MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8*. Nature, 1992. **356**(6372): p. 796-8.
4. Kagi, D., et al., *Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity*. Science, 1994. **265**(5171): p. 528-30.
5. Santambrogio, L., et al., *Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15056-61.
6. Leung, S., et al., *The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease*. Cell Mol Immunol, 2010. **7**(3): p. 182-9.
7. Umetsu, D.T. and R.H. DeKruyff, *TH1 and TH2 CD4+ cells in human allergic diseases*. J Allergy Clin Immunol, 1997. **100**(1): p. 1-6.
8. Kolb, H.J., et al., *Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients*. Blood, 1995. **86**(5): p. 2041-50.
9. Davis, M.M. and P.J. Bjorkman, *T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition*. Nature, 1988. **334**(6181): p. 395-402.
10. Arden, B., et al., *Human T-cell receptor variable gene segment families*. Immunogenetics, 1995. **42**(6): p. 455-500.
11. Rudolph, M.G., R.L. Stanfield, and I.A. Wilson, *How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 419-66.
12. Lefranc, M.P., et al., *IMGT(R), the international ImMunoGeneTics information system(R) 25 years on*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(Database issue): p. D413-22.
13. Sandor, Z., et al., *Distinct requirements for Ku in N nucleotide addition at V(D)J- and non-V(D)J-generated double-strand breaks*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(6): p. 1866-73.
14. Cabaniols, J.P., et al., *Most alpha/beta T cell receptor diversity is due to terminal deoxynucleotidyl transferase*. J Exp Med, 2001. **194**(9): p. 1385-90.
15. De Boer, R.J. and A.S. Perelson, *How diverse should the immune system be?* Proc Biol Sci, 1993. **252**(1335): p. 171-5.
16. Turner, S.J., et al., *Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(12): p. 883-94.
17. Rossjohn, J., et al., *T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules*. Annu Rev Immunol, 2015. **33**: p. 169-200.
18. Adams, J.J., et al., *Structural interplay between germline interactions and adaptive recognition determines the bandwidth of TCR-peptide-MHC cross-reactivity*. Nat Immunol, 2016. **17**(1): p. 87-94.
19. Schumacher, T.N., et al., *Peptide selection by MHC class I molecules*. Nature, 1991. **350**(6320): p. 703-6.
20. Guo, H.C., et al., *Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle*. Nature, 1992. **360**(6402): p. 364-6.
21. Speir, J.A., et al., *Two different, highly exposed, bulged structures for an unusually long peptide bound to rat MHC class I RT1-Aa*. Immunity, 2001. **14**(1): p. 81-92.
22. Collins, E.J., D.N. Garboczi, and D.C. Wiley, *Three-dimensional structure of a peptide extending from one end of a class I MHC binding site*. Nature, 1994. **371**(6498): p. 626-9.
23. Curtsinger, J.M. and M.F. Mescher, *Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(3): p. 333-40.
24. Li, X.C., D.M. Rothstein, and M.H. Sayegh, *Costimulatory pathways in transplantation: challenges and new developments*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 271-93.
25. Schwartz, R.H., *A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy*. Science, 1990. **248**(4961): p. 1349-56.
26. Jenkins, M.K., et al., *CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells*. J Immunol, 1991. **147**(8): p. 2461-6.
27. Larsen, C.P. and T.C. Pearson, *The CD40 pathway in allograft rejection, acceptance, and tolerance*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(5): p. 641-7.
28. Clarkson, M.R. and M.H. Sayegh, *T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance*. Transplantation, 2005. **80**(5): p. 555-63.

29. Harty, J.T. and V.P. Badovinac, *Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(2): p. 107-19.
30. Priyadharshini, B., D.L. Greiner, and M.A. Brehm, *T-cell activation and transplantation tolerance*. Transplant Rev (Orlando), 2012. **26**(3): p. 212-22.
31. Sykes, M., *Immune tolerance: mechanisms and application in clinical transplantation*. J Intern Med, 2007. **262**(3): p. 288-310.
32. Griesemer, A.D., E.C. Sorenson, and M.A. Hardy, *The role of the thymus in tolerance*. Transplantation, 2010. **90**(5): p. 465-74.
33. Yan, J. and M.J. Mamula, *Autoreactive T cells revealed in the normal repertoire: escape from negative selection and peripheral tolerance*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3188-94.
34. Alpdogan, O. and M.R. van den Brink, *Immune tolerance and transplantation*. Semin Oncol, 2012. **39**(6): p. 629-42.
35. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
36. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
37. Sankawa, Y., *[The immune system - how does anti-tumor immunity arise ?]*. Oncol Res Treat, 2014. **37 Suppl 4**: p. 2-5.
38. Jacobs, J.F., et al., *Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy?* Lancet Oncol, 2012. **13**(1): p. e32-42.
39. Maeda, H. and A. Shiraishi, *TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 73-8.
40. Gabilovich, D., *Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(12): p. 941-52.
41. Vinay, D.S., et al., *Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies*. Semin Cancer Biol, 2015. **35 Suppl**: p. S185-S198.
42. Staveley-O'Carroll, K., et al., *Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1178-83.
43. Foell, J., B. Hewes, and R.S. Mittler, *T cell costimulatory and inhibitory receptors as therapeutic targets for inducing anti-tumor immunity*. Curr Cancer Drug Targets, 2007. **7**(1): p. 55-70.
44. Kirkwood, J.M., et al., *Immunotherapy of cancer in 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(5): p. 309-35.
45. Wei, F., et al., *Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(27): p. E2480-9.
46. Buchbinder, E.I. and A. Desai, *CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition*. Am J Clin Oncol, 2016. **39**(1): p. 98-106.
47. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-23.
48. Callahan, M.K., M.A. Postow, and J.D. Wolchok, *CTLA-4 and PD-1 Pathway Blockade: Combinations in the Clinic*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 385.
49. Phan, G.Q., et al., *Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8372-7.
50. Eshhar, Z., et al., *Functional expression of chimeric receptor genes in human T cells*. J Immunol Methods, 2001. **248**(1-2): p. 67-76.
51. Dai, H., et al., *Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy*. J Natl Cancer Inst, 2016. **108**(7).
52. Zhou, G. and H. Levitsky, *Towards curative cancer immunotherapy: overcoming posttherapy tumor escape*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 124187.
53. <https://www.krebsinformationsdienst.de/fachkreise/nachrichten/2018/fk11-car-t-zell-therapie-krebs-zulassung.php>.
54. Grupp, S.A., et al., *Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia*. N Engl J Med, 2013. **368**(16): p. 1509-1518.
55. Heiblig, M., et al., *Adoptive immunotherapy for acute leukemia: New insights in chimeric antigen receptors*. World J Stem Cells, 2015. **7**(7): p. 1022-38.
56. Nestle, F.O., A. Farkas, and C. Conrad, *Dendritic-cell-based therapeutic vaccination against cancer*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(2): p. 163-9.
57. Buonaguro, L., et al., *Translating tumor antigens into cancer vaccines*. Clin Vaccine Immunol, 2011. **18**(1): p. 23-34.

58. Dudley, M.E., et al., *Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes*. Science, 2002. **298**(5594): p. 850-4.
59. Stratton, M.R., P.J. Campbell, and P.A. Futreal, *The cancer genome*. Nature, 2009. **458**(7239): p. 719-24.
60. Kreiter, S., et al., *Targeting the tumor mutanome for personalized vaccination therapy*. Oncoimmunology, 2012. **1**(5): p. 768-769.
61. Hunter, R.L., *Overview of vaccine adjuvants: present and future*. Vaccine, 2002. **20 Suppl 3**: p. S7-12.
62. Gouttefangeas, C. and H.G. Rammensee, *Personalized cancer vaccines: adjuvants are important, too*. Cancer Immunol Immunother, 2018.
63. Morefield, G.L., et al., *Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro*. Vaccine, 2005. **23**(13): p. 1588-95.
64. Tian, H., et al., *A novel cancer vaccine with the ability to simultaneously produce anti-PD-1 antibody and GM-CSF in cancer cells and enhance Th1-biased antitumor immunity*. Signal Transduct Target Ther, 2016. **1**: p. 16025.
65. Circelli, L., et al., *Immunological effects of a novel RNA-based adjuvant in liver cancer patients*. Cancer Immunol Immunother, 2017. **66**(1): p. 103-112.
66. Pol, J., et al., *Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy*. Oncoimmunology, 2015. **4**(4): p. e1008866.
67. Kroemer, G., et al., *Immunogenic cell death in cancer therapy*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 51-72.
68. Vacchelli, E., et al., *Current trends of anticancer immunochemotherapy*. Oncoimmunology, 2013. **2**(6): p. e25396.
69. Galluzzi, L., et al., *Classification of current anticancer immunotherapies*. Oncotarget, 2014. **5**(24): p. 12472-508.
70. Lesterhuis, W.J., et al., *Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(8): p. 3100-8.
71. Pasquier, E., M. Kavallaris, and N. Andre, *Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions*. Nat Rev Clin Oncol, 2010. **7**(8): p. 455-65.
72. Seo, Y.D. and V.G. Pillarisetty, *T-cell programming in pancreatic adenocarcinoma: a review*. Cancer Gene Ther, 2017. **24**(3): p. 106-113.
73. Tempero, M.A., et al., *Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2014: featured updates to the NCCN guidelines*. J Natl Compr Canc Netw, 2014. **12**(8): p. 1083-93.
74. Wellner, U.F., et al., *Locally advanced pancreatic head cancer: margin-positive resection or bypass? ISRN Surg, 2012. 2012: p. 513241.*
75. Assifi, M.M., et al., *Neoadjuvant therapy in pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis of phase II trials*. Surgery, 2011. **150**(3): p. 466-73.
76. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer facts and figures 2013*. CA Cancer J Clin, 2012. **63**: p. 11-30.
77. Bose, D., M.H.G. Katz, and J.B. Fleming, *Pancreatic Adenocarcinoma*, in *The M.D. Anderson Surgical Oncology Handbook*, B.W. Feig and C.D. Ching, Editors. 2012, Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia. p. 472-490.
78. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
79. Conroy, T., et al., *FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer*. N Engl J Med, 2011. **364**(19): p. 1817-25.
80. Faris, J.E., et al., *FOLFIRINOX in locally advanced pancreatic cancer: the Massachusetts General Hospital Cancer Center experience*. Oncologist, 2013. **18**(5): p. 543-8.
81. Gunturu, K.S., et al., *FOLFIRINOX for locally advanced and metastatic pancreatic cancer: single institution retrospective review of efficacy and toxicity*. Med Oncol, 2013. **30**(1): p. 361.
82. Mohammed, S., G. Van Buren, 2nd, and W.E. Fisher, *Pancreatic cancer: advances in treatment*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(28): p. 9354-60.
83. Chiorean, E.G., et al., *CA19-9 decrease at 8 weeks as a predictor of overall survival in a randomized phase III trial (MPACT) of weekly nab-paclitaxel plus gemcitabine versus gemcitabine alone in patients with metastatic pancreatic cancer*. Ann Oncol, 2016. **27**(4): p. 654-60.
84. Li, D., et al., *Pancreatic cancer*. Lancet, 2004. **363**(9414): p. 1049-57.
85. Wagner, M., et al., *Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma*. Br J Surg, 2004. **91**(5): p. 586-94.
86. Lopez, N.E., C. Prendergast, and A.M. Lowy, *Borderline resectable pancreatic cancer: definitions and management*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(31): p. 10740-51.

87. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(5): p. 277-300.
88. Hruban, R.H., A. Maitra, and M. Goggins, *Update on pancreatic intraepithelial neoplasia*. Int J Clin Exp Pathol, 2008. **1**(4): p. 306-16.
89. Pellegata, N.S., et al., *K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions*. Cancer Res, 1994. **54**(6): p. 1556-60.
90. Hezel, A.F., et al., *Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma*. Genes Dev, 2006. **20**(10): p. 1218-49.
91. Bardeesy, N., et al., *Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer*. Genes Dev, 2006. **20**(22): p. 3130-46.
92. Takaori, K., et al., *Pancreatic intraepithelial neoplasia*. Pancreas, 2004. **28**(3): p. 257-62.
93. Gedde-Dahl, T., 3rd, et al., *T-cell responses against products of oncogenes: generation and characterization of human T-cell clones specific for p21 ras-derived synthetic peptides*. Hum Immunol, 1992. **33**(4): p. 266-74.
94. Fossum, B., et al., *Overlapping epitopes encompassing a point mutation (12 Gly-->Arg) in p21 ras can be recognized by HLA-DR, -DP and -DQ restricted T cells*. Eur J Immunol, 1993. **23**(10): p. 2687-91.
95. Weden, S., et al., *Long-term follow-up of patients with resected pancreatic cancer following vaccination against mutant K-ras*. Int J Cancer, 2011. **128**(5): p. 1120-8.
96. Redston, M.S., et al., *p53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homocopolymer tracts in DNA microdeletions*. Cancer Res, 1994. **54**(11): p. 3025-33.
97. Imai, K., et al., *Identification of HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel tumour-associated antigen, KIF20A, overexpressed in pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2011. **104**(2): p. 300-7.
98. Terashima, T., et al., *P53, hTERT, WT-1, and VEGFR2 are the most suitable targets for cancer vaccine therapy in HLA-A24 positive pancreatic adenocarcinoma*. Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(5): p. 479-89.
99. Kaufman, H.L., et al., *Poxvirus-based vaccine therapy for patients with advanced pancreatic cancer*. J Transl Med, 2007. **5**: p. 60.
100. Gilliam, A.D., et al., *An international multicenter randomized controlled trial of G17DT in patients with pancreatic cancer*. Pancreas, 2012. **41**(3): p. 374-9.
101. Coveler, A.L., et al., *Algenpantucel-L immunotherapy in pancreatic adenocarcinoma*. Immunotherapy, 2016. **8**(2): p. 117-25.
102. Le, D.T., et al., *Safety and survival with GVAX pancreas prime and Listeria Monocytogenes-expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer*. J Clin Oncol, 2015. **33**(12): p. 1325-33.
103. Siegmund-Schultze, N., *Allogene Stammzelltransplantation: Nachschub aus der Nabelschnur*. Deutsches Ärzteblatt 2009. **106**(3).
104. Harris, A.C., J.L. Ferrara, and J.E. Levine, *Advances in predicting acute GVHD*. Br J Haematol, 2013. **160**(3): p. 288-302.
105. Felix, N.J. and P.M. Allen, *Specificity of T-cell alloreactivity*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(12): p. 942-53.
106. Falkenburg, J.H., et al., *Minor histocompatibility antigens in human stem cell transplantation*. Exp Hematol, 2003. **31**(9): p. 743-51.
107. Loiseau, P., et al., *HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival*. Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**(8): p. 965-74.
108. Ratanatharathorn, V., et al., *Phase III study comparing methotrexate and tacrolimus (prograf, FK506) with methotrexate and cyclosporine for graft-versus-host disease prophylaxis after HLA-identical sibling bone marrow transplantation*. Blood, 1998. **92**(7): p. 2303-14.
109. Szyska, M. and I.K. Na, *Bone Marrow GvHD after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 118.
110. Antin, J.H. and J.L. Ferrara, *Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease*. Blood, 1992. **80**(12): p. 2964-8.
111. Vogelsang, G.B., L. Lee, and D.M. Bensen-Kennedy, *Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant*. Annu Rev Med, 2003. **54**: p. 29-52.
112. Ferrara, J.L., et al., *Graft-versus-host disease*. Lancet, 2009. **373**(9674): p. 1550-61.
113. Welniak, L.A., B.R. Blazar, and W.J. Murphy, *Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 139-70.



114. Ferrara, J.L. and H.J. Deeg, *Graft-versus-host disease*. N Engl J Med, 1991. **324**(10): p. 667-74.
115. Shustov, A., et al., *Differential expression of Fas and Fas ligand in acute and chronic graft-versus-host disease: up-regulation of Fas and Fas ligand requires CD8+ T cell activation and IFN-gamma production*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 2848-55.
116. Lee, S.J., et al., *Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse*. Blood, 2002. **100**(2): p. 406-14.
117. Carlens, S., et al., *Risk factors for chronic graft-versus-host disease after bone marrow transplantation: a retrospective single centre analysis*. Bone Marrow Transplant, 1998. **22**(8): p. 755-61.
118. Pidala, J., et al., *Biologic markers of chronic GVHD*. Bone Marrow Transplant, 2014. **49**(3): p. 324-31.
119. Krenger, W. and G.A. Hollander, *The thymus in GVHD pathophysiology*. Best Pract Res Clin Haematol, 2008. **21**(2): p. 119-28.
120. Martin, P.J., *Biology of chronic graft-versus-host disease: implications for a future therapeutic approach*. Keio J Med, 2008. **57**(4): p. 177-83.
121. Shimabukuro-Vornhagen, A., et al., *The role of B cells in the pathogenesis of graft-versus-host disease*. Blood, 2009. **114**(24): p. 4919-27.
122. Shlomchik, W.D., *Graft-versus-host disease*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 340-52.
123. Toubai, T., Y. Sun, and P. Reddy, *GVHD pathophysiology: is acute different from chronic?* Best Pract Res Clin Haematol, 2008. **21**(2): p. 101-17.
124. Pace, N.R. and D.S. Waugh, *Design of simplified ribonuclease P RNA by phylogenetic comparison*. Methods Enzymol, 1991. **203**: p. 500-10.
125. Chen, J., et al., *Kinesin superfamily protein expression and its association with progression and prognosis in hepatocellular carcinoma*. J Cancer Res Ther, 2017. **13**(4): p. 651-659.
126. Andreatta, M. and M. Nielsen, *Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system*. Bioinformatics, 2016. **32**(4): p. 511-7.
127. Nielsen, M., et al., *Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations*. Protein Sci, 2003. **12**(5): p. 1007-17.
128. Rammensee, H., et al., *SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs*. Immunogenetics, 1999. **50**(3-4): p. 213-9.
129. Rosenberg, S.A., et al., *Altered CD8(+) T-cell responses when immunizing with multiepitope peptide vaccines*. J Immunother, 2006. **29**(2): p. 224-31.
130. Sasada, T., et al., *Personalized peptide vaccine for treatment of advanced cancer*. Curr Med Chem, 2014. **21**(21): p. 2332-45.
131. Born, W.K., M. Kemal Aydinug, and R.L. O'Brien, *Diversity of gammadelta T-cell antigens*. Cell Mol Immunol, 2013. **10**(1): p. 13-20.
132. Holoshitz, J., et al., *Dual antigenic recognition by cloned human gamma delta T cells*. J Clin Invest, 1992. **89**(1): p. 308-14.
133. Roark, C.E., et al., *Response of a gamma delta+ T cell receptor invariant subset during bacterial infection*. J Immunol, 1996. **156**(6): p. 2214-20.
134. Takeuchi, A., et al., *CRTAM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage*. J Exp Med, 2016. **213**(1): p. 123-38.
135. Takeuchi, A. and T. Saito, *CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4(+) T Cells, Their Differentiation and Function*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 194.
136. Klenerman, P. and A. Oxenius, *T cell responses to cytomegalovirus*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(6): p. 367-77.
137. Andreatta, M., et al., *Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification*. Immunogenetics, 2015. **67**(11-12): p. 641-50.
138. Castano, A.R., et al., *Peptide binding and presentation by mouse CD1*. Science, 1995. **269**(5221): p. 223-6.
139. He, X., et al., *Dual receptor T cells extend the immune repertoire for foreign antigens*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 127-34.
140. Geginat, J., A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4260-6.
141. Tian, Y., A. Sette, and D. Weiskopf, *Cytotoxic CD4 T Cells: Differentiation, Function, and Application to Dengue Virus Infection*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 531.
142. Montico, B., et al., *Immunogenic Apoptosis as a Novel Tool for Anticancer Vaccine Development*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(2).

143. Showalter, A., et al., *Cytokines in immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy*. Cytokine, 2017. **97**: p. 123-132.
144. Ashkenazi, A. and V.M. Dixit, *Death receptors: signaling and modulation*. Science, 1998. **281**(5381): p. 1305-8.
145. K. Gülow, M.K., K. Darvas, P.H. Krammer, *Oxidative Signale und molekulare Mechanismen der T-Zellrezeptor vermittelten Apoptose*. Forschungsschwerpunkt D Tumorimmunologie Abteilung D030 Immunogenetik, 2004.
146. Refaeli, Y., et al., *Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis*. Immunity, 1998. **8**(5): p. 615-23.
147. Strand, S. and P.R. Galle, *Immune evasion by tumours: involvement of the CD95 (APO-1/Fas) system and its clinical implications*. Mol Med Today, 1998. **4**(2): p. 63-8.
148. Waldmann, T.A. and Y. Tagaya, *The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 19-49.
149. Winograd, R., et al., *Induction of T-cell Immunity Overcomes Complete Resistance to PD-1 and CTLA-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(4): p. 399-411.
150. Jager, E., et al., *Peptide-specific CD8+ T-cell evolution in vivo: response to peptide vaccination with Melan-A/MART-1*. Int J Cancer, 2002. **98**(3): p. 376-88.
151. Muller, S.M., et al., *Similar pattern of thymic-dependent T-cell reconstitution in infants with severe combined immunodeficiency after human leukocyte antigen (HLA)-identical and HLA-nonidentical stem cell transplantation*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4344-9.
152. Penit, C., B. Lucas, and F. Vasseur, *Cell expansion and growth arrest phases during the transition from precursor (CD4-8-) to immature (CD4+8+) thymocytes in normal and genetically modified mice*. J Immunol, 1995. **154**(10): p. 5103-13.
153. Krenger, W., B.R. Blazar, and G.A. Hollander, *Thymic T-cell development in allogeneic stem cell transplantation*. Blood, 2011. **117**(25): p. 6768-76.
154. Koble, C., *Selbstantigen-Präsentation in der Thymus-Medulla : zur spezifischen Rolle von Epithelzellen versus Dendritische Zellen in zentraler T Zell-Toleranz*. 2008.
155. Marquez, C., et al., *The development of T and non-T cell lineages from CD34+ human thymic precursors can be traced by the differential expression of CD44*. J Exp Med, 1995. **181**(2): p. 475-83.
156. Melkus, M.W., et al., *Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1*. Nat Med, 2006. **12**(11): p. 1316-22.
157. Tonomura, N., et al., *Antigen-specific human T-cell responses and T cell-dependent production of human antibodies in a humanized mouse model*. Blood, 2008. **111**(8): p. 4293-6.
158. Zhang, B., Z. Duan, and Y. Zhao, *Mouse models with human immunity and their application in biomedical research*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(6): p. 1043-58.
159. Hollander, G.A., B. Widmer, and S.J. Burakoff, *Loss of normal thymic repertoire selection and persistence of autoreactive T cells in graft vs host disease*. J Immunol, 1994. **152**(4): p. 1609-17.
160. van den Brink, M.R., et al., *Graft-versus-host-disease-associated thymic damage results in the appearance of T cell clones with anti-host reactivity*. Transplantation, 2000. **69**(3): p. 446-9.
161. Gress, R.E., et al., *Lymphoid reconstruction and vaccines*. Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**(1 Suppl 1): p. 17-22.
162. Gardner, J.M., et al., *AIRE in the thymus and beyond*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(6): p. 582-9.
163. Hassan, M.N. and E.K. Waller, *GVHD clears the Aire in thymic selection*. Blood, 2015. **125**(17): p. 2593-5.
164. Jamil, M.O. and S. Mineishi, *State-of-the-art acute and chronic GVHD treatment*. Int J Hematol, 2015. **101**(5): p. 452-66.
165. Fefer, A., et al., *Graft versus leukemia effect in man: the relapse rate of acute leukemia is lower after allogeneic than after syngeneic marrow transplantation*. Prog Clin Biol Res, 1987. **244**: p. 401-8.
166. Gale, R.P., et al., *Identical-twin bone marrow transplants for leukemia*. Ann Intern Med, 1994. **120**(8): p. 646-52.
167. Baker, B.S., et al., *Epidermal T lymphocytes and HLA-DR expression in psoriasis*. Br J Dermatol, 1984. **110**(5): p. 555-64.
168. Bjerke, J.R., H.K. Krogh, and R. Matre, *Characterization of mononuclear cell infiltrates in psoriatic lesions*. J Invest Dermatol, 1978. **71**(5): p. 340-3.

169. Champlin, R.E., et al., *Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation*. IBMTR Histocompatibility and Stem Cell Sources Working Committee and the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Blood*, 2000. **95**(12): p. 3702-9.
170. Van Caeneghem, Y., et al., *Antigen receptor-redirected T cells derived from hematopoietic precursor cells lack expression of the endogenous TCR/CD3 receptor and exhibit specific antitumor capacities*. *Oncoimmunology*, 2017. **6**(3): p. e1283460.
171. Ali, N., et al., *Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2R $\gamma$ manull mice display a T-effector memory phenotype*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e44219.
172. Bourcier, K.D., et al., *Conserved CDR3 regions in T-cell receptor (TCR) CD8(+) T cells that recognize the Tax11-19/HLA-A\*0201 complex in a subject infected with human T-cell leukemia virus type 1: relationship of T-cell fine specificity and major histocompatibility complex/peptide/TCR crystal structure*. *J Virol*, 2001. **75**(20): p. 9836-43.
173. Kondo, T., et al., *TCR repertoire to proteolipid protein (PLP) in multiple sclerosis (MS): homologies between PLP-specific T cells and MS-associated T cells in TCR junctional sequences*. *Int Immunol*, 1996. **8**(1): p. 123-30.
174. Kita, Y., et al., *T cell receptor clonotypes in skin lesions from patients with systemic lupus erythematosus*. *J Invest Dermatol*, 1998. **110**(1): p. 41-6.
175. Fujishima, N., et al., *Skewed T cell receptor repertoire of Vdelta1(+) gammadelta T lymphocytes after human allogeneic haematopoietic stem cell transplantation and the potential role for Epstein-Barr virus-infected B cells in clonal restriction*. *Clin Exp Immunol*, 2007. **149**(1): p. 70-9.
176. White, B. and V.V. Yurovsky, *Oligoclonal expansion of V delta 1+ gamma/delta T-cells in systemic sclerosis patients*. *Ann N Y Acad Sci*, 1995. **756**: p. 382-91.
177. Karnell, J.L., et al., *Targeting the CD40-CD40L pathway in autoimmune diseases: Humoral immunity and beyond*. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019. **141**: p. 92-103.
178. Zhang, Y., et al., *Alloreactive memory T cells are responsible for the persistence of graft-versus-host disease*. *J Immunol*, 2005. **174**(5): p. 3051-8.
179. Skert, C., et al., *Kinetics of Th1/Th2 cytokines and lymphocyte subsets to predict chronic GVHD after allo-SCT: results of a prospective study*. *Bone Marrow Transplant*, 2009. **44**(11): p. 729-37.
180. Hayashida, J.N., et al., *Possible involvement of cytokines, chemokines and chemokine receptors in the initiation and progression of chronic GVHD*. *Bone Marrow Transplant*, 2013. **48**(1): p. 115-23.
181. Choonhakarn, C., et al., *Haplotype associations of the major histocompatibility complex with psoriasis in Northeastern Thais*. *Int J Dermatol*, 2002. **41**(6): p. 330-4.
182. Catanzaro, D., et al., *Computer-aided human leukocyte antigen association studies: a case study for psoriasis and severe alopecia areata*. *Hum Immunol*, 2010. **71**(8): p. 783-8.
183. Schmitt-Egenolf, M., et al., *Familial juvenile onset psoriasis is associated with the human leukocyte antigen (HLA) class I side of the extended haplotype Cw6-B57-DRB1\*0701-DQA1\*0201-DQB1\*0303: a population- and family-based study*. *J Invest Dermatol*, 1996. **106**(4): p. 711-4.
184. Bridges, S.L., Jr., J.M. Kelley, and L.B. Hughes, *The HLA-DRB1 shared epitope in Caucasians with rheumatoid arthritis: a lesson learned from tic-tac-toe*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(5): p. 1211-5.
185. Sonntag, K., et al., *Chronic graft-versus-host-disease in CD34(+)-humanized NSG mice is associated with human susceptibility HLA haplotypes for autoimmune disease*. *J Autoimmun*, 2015. **62**: p. 55-66.
186. Greenblatt, M.B., et al., *Graft versus host disease in the bone marrow, liver and thymus humanized mouse model*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e44664.
187. Mueller, D.L., *Mechanisms maintaining peripheral tolerance*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(1): p. 21-7.
188. Pacheco, Y., et al., *Bystander activation and autoimmunity*. *J Autoimmun*, 2019. **103**: p. 102301.

## 6 Danksagung

Zunächst möchte ich mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung der Dissertation unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Handgretinger für die Möglichkeit diese Arbeit in der Kinderklinik in seiner Abteilung anzufertigen.

Besonders herzlich danken möchte ich Frau Prof. Karin Schilbach, für die Bereitstellung des Themas, die Finanzierung des Projektes und die fachliche und menschliche Kompetenz, mit der Sie mir während der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite stand. Ihre Vorschläge zur Bewältigung unterschiedlichster Herausforderungen, ihre hervorragende Betreuung und stete Diskussionsbereitschaft und ihr Wissen haben diese Zeit im Labor spannend und motivierend gemacht. Herzlich danken möchte ich ihr aber auch für ihre Bestärkung, mich für ein Medizinstudium zu entscheiden und für ihre Unterstützung bei der Bewerbung.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Stefan Stevanović ganz herzlich für die Betreuung der Arbeit bedanken.

Ein großer Dank gilt auch der Jürgen-Manchot-Stiftung, die mich während der Promotion mit einem Stipendium finanziell unterstützten.

Bei den beiden Kodoktoranden Christian Welker und Jenny Bauer möchte ich mich ganz herzlich für die gemeinsame Zeit im Labor mit toller Arbeitsatmosphäre, gemeinsamen wissenschaftlichem Arbeiten und Diskutieren aber auch privaten Gesprächen bedanken. Auch bei Dr. Hisayoshi Hashimoto möchte ich mich für die Zusammenarbeit und die Unterstützung beim Schreiben und Publizieren bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei dem gesamten Laborteam bedanken, die sich viel Zeit für die Einarbeitung in die komplexe Methodik genommen haben, besonders Friederike Müller, die gute und liebevolle Seele des Labors.

Zuletzt noch ein Dank an meine lieben Eltern Ines und Steffen Sonntag, die mich während meines gesamten Studiums und der Promotion in jeder Hinsicht unterstützt haben sowie mein lieber Mann Frank Kühn, der mich während meiner gesamten Promotion und auch im Zweitstudium in jeder Hinsicht unterstützte, sich selten über lange Labortage und Lernphasen beklagte, mir in stressigen Phasen den Rücken freigehalten hat und mir menschlich, finanziell und kulinarisch die Basis für diese Ausbildung geschaffen hat.

## 7 Anhang

**Paper 1:** Immune monitoring and TCR sequencing of CD4 T cells in a long term responsive patient with metastasized pancreatic ductal carcinoma treated with individualized, neoepitope-derived multi-peptide vaccines: a case report

Sonntag, K., H. Hashimoto, M. Eylich, M. Menzel, M. Schubach, D. Docker, F. Battke, C. Courage, H. Lambertz, R. Handgretinger, S. Biskup and K. Schilbach (2018). "Immune monitoring and TCR sequencing of CD4 T cells in a long term responsive patient with metastasized pancreatic ductal carcinoma treated with individualized, neoepitope-derived multi-peptide vaccines: a case report." J Transl Med **16**(1): 23.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1382-1>

**Paper 2:** Chronic graft-versus-host-disease in CD34(+)-humanized NSG mice is associated with human susceptibility HLA haplotypes for autoimmune disease

Sonntag, K., F. Eckert, C. Welker, H. Müller, F. Müller, D. Zips, B. Sipos, R. Klein, G. Blank, T. Feuchtinger, M. Schumm, R. Handgretinger and K. Schilbach (2015). "Chronic graft-versus-host-disease in CD34(+)-humanized NSG mice is associated with human susceptibility HLA haplotypes for autoimmune disease." J Autoimmun **62**: 55-66.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.06.006>

RESEARCH

Open Access



# Immune monitoring and TCR sequencing of CD4 T cells in a long term responsive patient with metastasized pancreatic ductal carcinoma treated with individualized, neoepitope-derived multi-peptide vaccines: a case report

Katja Sonntag<sup>1</sup>, Hisayoshi Hashimoto<sup>1</sup>, Matthias Eyrych<sup>2</sup>, Moritz Menzel<sup>3</sup>, Max Schubach<sup>4</sup>, Dennis Döcker<sup>3</sup>, Florian Battke<sup>3</sup>, Carolina Courage<sup>5</sup>, Helmut Lambertz<sup>6</sup>, Rupert Handgretinger<sup>1</sup>, Saskia Biskup<sup>3</sup> and Karin Schilbach<sup>1,7\*</sup>

## Abstract

**Background:** Cancer vaccines can effectively establish clinically relevant tumor immunity. Novel sequencing approaches rapidly identify the mutational fingerprint of tumors, thus allowing to generate personalized tumor vaccines within a few weeks from diagnosis. Here, we report the case of a 62-year-old patient receiving a four-peptide-vaccine targeting the two sole mutations of his pancreatic tumor, identified via exome sequencing.

**Methods:** Vaccination started during chemotherapy in second complete remission and continued monthly thereafter. We tracked IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cell responses against vaccine peptides in peripheral blood after 12, 17 and 34 vaccinations by analyzing T-cell receptor (TCR) repertoire diversity and epitope-binding regions of peptide-reactive T-cell lines and clones. By restricting analysis to sorted IFN- $\gamma$ -producing T cells we could assure epitope-specificity, functionality, and T<sub>H</sub>1 polarization.

**Results:** A peptide-specific T-cell response against three of the four vaccine peptides could be detected sequentially. Molecular TCR analysis revealed a broad vaccine-reactive TCR repertoire with clones of discernible specificity. Four identical or convergent TCR sequences could be identified at more than one time-point, indicating timely persistence of vaccine-reactive T cells. One dominant TCR expressing a dual TCR $\alpha$  chain could be found in three T-cell clones. The observed T-cell responses possibly contributed to clinical outcome: The patient is alive 6 years after initial diagnosis and in complete remission for 4 years now.

**Conclusions:** Therapeutic vaccination with a neoantigen-derived four-peptide vaccine resulted in a diverse and long-lasting immune response against these targets which was associated with prolonged clinical remission. These data warrant confirmation in a larger proof-of concept clinical trial.

**Keywords:** Pancreatic carcinoma, Therapeutic vaccines, Neoepitope-derived peptides, T-cell responses, CDR3 sequences

\*Correspondence: Karin.Schilbach@med.uni-tuebingen.de

<sup>7</sup> University Children's Hospital, University Medical Center Tübingen, Hoppe-Seyler-Street 1, 72076 Tübingen, Germany

Full list of author information is available at the end of the article

## Background

Pancreatic cancer represents an aggressive cancer entity with high morbidity and mortality—especially for patients with advanced and metastatic diseases. The overall 5-year survival probability is less than 5% [1–4]. Therefore, novel therapeutic options are urgently needed. Within the past decade, enthusiasm of using vaccines as anticancer agents has revived. Data collected so far document that a variety of anticancer vaccines including cell-, DNA-, and purified component-based vaccines are capable of circumventing the poorly immunogenic and highly immunosuppressive nature of most tumors and eliciting therapeutically relevant immune responses [5, 6]. Various lines of evidence suggest that pancreatic adenocarcinoma can also induce anti-tumoral T-cell responses [7–9], thus “off-the-shelf” peptide vaccines (KRAS, Gastrin G17DT, HSP-CC-96, WT1, VEGF-R and2, hTERT, Her2/neu, KIF20A [10]), recombinant vaccines (MUC-1- and CEA-expressing poxviruses with GM-CSF), live attenuated *Listeria mesothelin*-expressing vaccines, irradiated whole allogenic tumor and *Listeria* [11], as well as inactivated whole tumor cell vaccines (Algenpantucel-L, allogeneic GM-CSF) have been evaluated for therapy in this type of cancer [12–14]. Preliminary studies yielded promising results, yet could not demonstrate significant improvement of patient survival. Nevertheless, they emphasized several critical aspects for the design of successful next-generation cancer vaccines, namely: (i) cancer vaccines should target tumor-specific antigens not expressed on healthy tissue, (ii) the applied adjuvant should potentially activate antigen-presenting cells (APCs) which in turn stimulate antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) [15], and (iii) vaccine schedules should include strategies for breaking immunological tolerance.

Non-self-antigens like unique neo-antigens created by tumor specific mutations have hitherto been cumbersome to detect. The laborious search for tumor-specific mutations including cDNA expression cloning, serologic analysis of recombinant cDNA expression libraries (SEREX), and reverse immunological approaches [16] was dramatically simplified with the advent of next-generation sequencing (NGS) technologies. Entire cancer exomes can be sequenced and compared with healthy tissue (germline) exome, providing the fundamentally new opportunity to cover the patient’s individual aberrancy within a personalized vaccine. Such an approach integrates the tremendous heterogeneity of tumors and increases the probability of generating a tumor-specific immune response, since T cells theoretically should bind with a higher affinity to neo-antigens that have not been subject to thymic negative selection. In this context, oncogenic driver mutations are not necessarily

tumor-rejecting antigens [10, 17, 18], and therapeutically useful targets may be generated from individual passenger mutations as well [19].

As the induction of cell-mediated immunity requires antigen-presentation by activated professional antigen-presenting cells (APCs) [20], vaccines must be administered in conjunction with adjuvants such as incomplete Freund’s adjuvant, diverse TLR agonists, alum, or immunostimulatory cytokines such as GM-CSF. In the present study GM-CSF was chosen, since it boosted the vaccine efficiency in the first licensed cancer vaccine Provenge [21], and improved patient outcome in phase 3 studies when applied in combination with suitable anti-tumor vaccines [22].

Considerable progress towards enhancing vaccine efficacy has been achieved by combining anti-cancer vaccines with a varied panel of therapeutics, aiming to break the immune-suppressive nature of the tumor milieu [23]. Among those agents working synergistically with immune interventions are diverse inhibitors of checkpoint molecules, targeted and/or chemo-therapies that can induce immunogenic cell death (ICD) [5, 23–25]. One of those compounds is oxaliplatin, a platinum derivative and part of the Folfirinox regimen (fluorouracil/leucovorin, irinotecan, oxaliplatin), a drug combination frequently used in the treatment of pancreatic cancer [26, 27]. This regimen combines agents that stimulate the release of danger signals, upregulates cellular tumor antigens, and induces ICD [23]. In addition, oxaliplatin reduces the expression of PD-L2, thus enhances antigen-specific proliferation and Th1 cytokine secretion [28], while 5-FU induces apoptosis selectively in MDSC and attenuates  $T_{reg}$  activity. Therefore, the Folfirinox regimen may induce synergies with immunotherapy by neutralizing immunosuppression and fueling neo-antigen-specific immunity [29–31].

Here, we characterize the T-cell response of a patient receiving a 4-peptide-vaccine targeting the two sole mutations of his tumor in an individual patient treatment approach. Our data show the ability of vaccine-peptides to elicit antigen-specific immunity against pancreatic carcinoma antigens. We demonstrate the broadness of the induced T-cell repertoire, its persistence and modulation over time, as well as novel aspects of vaccine-induced T-cell responses.

## Methods

### Patient data

A 62 year old male patient was diagnosed with pancreatic ductal carcinoma in September 2011 and subsequently underwent pylorus-preserving duodenocephalo-pancreatectomy in October 2011. According

to UICC TNM nomenclature the tumor was classified as an incompletely resected (R1), poorly differentiated ductal adenocarcinoma Stage IIB, pT3pN1M0. According to standard treatment guidelines the patient received 6 cycles of Gemcitabine. Six months later (7/2012), a metastasis in the liver was diagnosed and probed, yet not surgically resected. Subsequently, second line chemotherapy was started 9/2012 with application of the Folfirinox regimen. 10 months later (7/2013), after 19 cycles of Folfirinox, the patient was radiologically in second complete remission, the tumor marker CA19-9 had returned to normal range and therapeutic vaccination with tumor-specific peptides was initiated. Vaccine induction regimen consisted of five peptide vaccinations combined with GM-CSF (Leukine, Berlex, Berlin, Germany) as an adjuvant on days 1, 3, 7, 14 and 28, followed by monthly vaccine boosts. No vaccine-related adverse events were observed. Folfirinox chemotherapy continued in parallel for another 7 cycles until January 2014 and was finally halted after a total of 26 cycles. Peptide vaccination is currently ongoing. The patient has been in complete remission (CR) for more than 4 years, i.e. 6 years after diagnosis. Time line of events is detailed in Fig. 1.

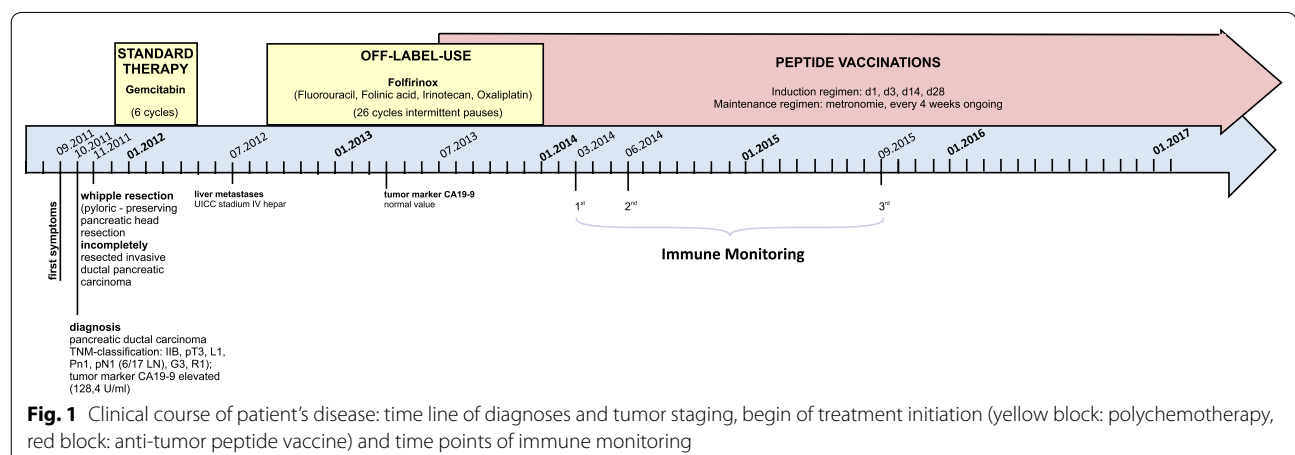
The patient gave his written informed consent for the collection of blood and tissue samples and additional consent was obtained for using this approach also for investigational purposes based on a biospecimen utilization protocol.

Staging, surgical resection, diagnostic procedures and adjuvant chemotherapy was applied according to standard treatment algorithms. Molecular work-up of the liver metastasis, peptide design and manufacturing was commissioned to commercial service providers by the patient. Peptide injections were carried out by the patient's general practitioner.

### Identification of neo-antigens and peptide design

Genomic DNA was isolated from a liver metastasis biopsy of the pancreatic carcinoma and a blood sample of the patient (reference tissue). The samples were enriched for whole exome sequencing (Agilent In-Solution Technology) and sequenced on a SOLiD 5500xl next generation sequencing platform (Applied Biosystems/Life Technologies now Thermo Fisher Scientific). The sequence information derived from the tumor tissue was bioinformatically compared with the sequence information derived from the reference tissue. The called variants were then reviewed manually. One missense variant was identified, namely within the RIM1-Gene, c.[402G > A], p.[Met134Ile] (according to NM\_024945). Gene expression analysis of the altered sequence on mRNA level was performed for verification (RNA isolation from fresh frozen tissue). A second mutation with ambiguous quality was found in the KIF4B-Gene. Since this mutation also represents a potential anti-tumor target, this variant was also used for neo-epitope delineation.

For the design of vaccine peptides, epitope prediction was performed with the HLA class I peptide binding algorithms NetMHC [32, 33] and SYFPEITHI [34] (Table 1). Two peptides—predicted to bind to the patients HLA class I—were designed for each neo-sequence by laying a virtual 9 amino acid frame onto the respective mutated sequence. 2 peptides differing from one another in the 5' and 3' end, respectively (Fig. 2) were chosen for vaccination purposes according to optimum likelihood to be presented by the patients HLA ligands (A01:01, A02:01; B18:01, B44:02; C07:01, C05:041, DRB1 11:01, DRB1 13:01 DQB1 03:01, DQB1 06:03) Peptide 1: RMI1<sub>127-136</sub> epitope (WEAKPSRIL), peptide 2; KIF4B<sub>736-747</sub> epitope (GIAARVKNWL), peptide 3; KIF4B<sub>738-748</sub> epitope (KEGIAARVKNW), and peptide 4; RMI1<sub>128-136</sub> epitope (EAKPSRILM)).



**Fig. 1** Clinical course of patient's disease: time line of diagnoses and tumor staging, begin of treatment initiation (yellow block: polychemotherapy, red block: anti-tumor peptide vaccine) and time points of immune monitoring



**Table 1 The binding scores of individual peptides for the patient's HLA class I and II haplotypes and CD1d**

Pep- tide	Protien origin	Peptide sequence	MHC class I	Net MHC [32, 33]	Syfpeithi [34]	CD1d	Castano [55]	MHC class II	Net MHC II pan3.1 [35]
1	RIM1	WEAKPSR <u>IL</u>  (WEAKPSR <u>I</u> )	B*18	WB	+(17)	CD1d	–	DRB1*1101	NB
			B*44	WB		CD1d	–	DRB1*1301	NB
			B*44	SB	–	–			
2	KIF4B	GIAARV <u>K</u> NWL	A*02	NB	+(22)	CD1d	+	DRB1*1101	WB
								DRB1*1301	WB
3	KIF4B	KEGIAARV <u>K</u> NW  (EGIAARV <u>K</u> NW)	B*44	WB	–(14)	CD1d	+	DRB1*1101	NB
			B*44	SB		–(14)	CD1d	+	DRB1*1301
4	RIM1	EAKPSR <u>L</u> LM	A*02	NB	–(6)	CD1d	–	DRB1*1101	NB
								DRB1*1301	NB

The binding scores of individual peptides for the patient's HLA haplotypes were determined via NetMHC [32, 33], SYFPEITHI [34], CD1d-binding algorithm according to "Castano" (1-4-7 rule) [55] and NetMHCIIpan version 3.1 [35]

Then likelihood for presentation is given as "+" and "-" respectively; SYFPEITHI half max scores regarding MHC class I presentation are given in brackets. Mutations in the peptides are indicated by underline

WB weak binder, SB strong binder, NB no binding predicted

### Application of the vaccine

Vaccination regimen started with a priming phase by vaccinating the patient on days 1, 3, 8, 15 and 29, and then continued by monthly boost vaccines for maintenance. The peptide cocktail was applied intracutaneously, the adjuvant GM-CSF (sargramostin 250 µg/injection, Leukine®) was applied subcutaneously.

### Vaccination peptide synthesis and vaccine formulation

Vaccination peptides were ordered commercially (American Peptide Company) by the patient. Before injection, the lyophilized peptides were dissolved in DMSO (Hybri-Max, sterile filtered, Sigma-Aldrich) and further diluted in water (Aqua ad injectabilia, B. Braun, Melsungen, Germany) to a final concentration of 0.8 mg/ml per peptide (400 µg/500 µl vaccination dose per peptide).

### Immune monitoring

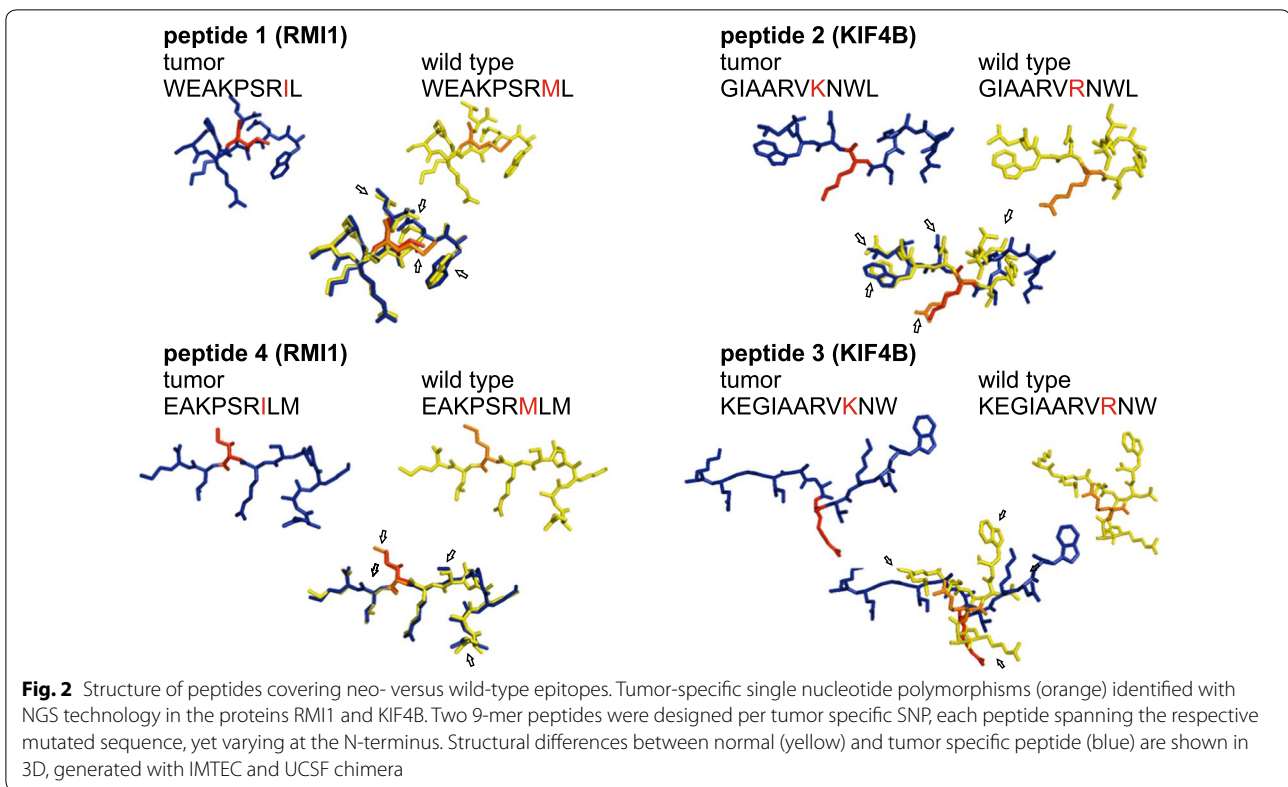
#### Enrichment of peptide-specific T cells

Immune monitoring was carried out at three defined time points: *IM1* 28 weeks, *IM2* 44 weeks, and *IM3* 108 weeks after initiation of peptide vaccines (after having received 8, 12 and 28 vaccinations). At the respective time points, patient PBMCs from freshly drawn heparinized blood were isolated with Ficoll Isopaque density gradient centrifugation (Pharmacia, Uppsala, Sweden) and cultured in RPMI1640 (10% FBS, P/S, Glu) supplemented with low dose IL-2 (20U/ml), IL-7 (2 ng/ml) and vaccine peptide- (10 µg/ml) or PBS-pulsed (controls) autologous feeder cells to bias survival of potentially in vivo primed T cells. Fresh medium containing 10% FBS supplemented with IL-2 (20U/ml) and IL-7 (2 ng/ml) was provided twice per week, whereas peptide stimulus was given only

at day 7 of culture. At day 12, cells were restimulated with peptide-pulsed (10 µg/ml) PBMCs and T cells responding to vaccine-peptide stimulus with IFN-γ production were isolated 5 h later using IFN-γ Secretion Assay Kit (Miltenyi Biotech, Germany) according to the manufacturer's instructions. Isolated cells were analyzed for the complexity of their T-cell receptor repertoire and epitope-binding region (CDR3 sequence). In *IM1*, PBMCs were stimulated with a pool of all four peptides, in *IM2* the four vaccine peptides were analyzed separately, in *IM3* cloning experiments were performed which allowed a more detailed identification of peptide-specific TCRs. CDR3 size spectratyping of unmanipulated peripheral T cells and direct sequencing of single prominent peaks was performed at all time points. Additional file 1: Fig. S1 provides an overview of immune monitoring techniques.

#### Cloning of neo-antigen-specific T cells for identification of TCR heterodimers

IFN-γ -selected T cells were expanded for 1 week in standard RPMI1640 supplemented with IL-7 (10 ng/ml), IL-2 (100 U/ml), and IL-15 (10 ng/ml) and subsequently cloned following standard limiting dilution procedure (0.3 cells in a 96-round-bottom-well with 10<sup>5</sup> feeder cells (80 Gy-irradiated autologous PBMCs). After 3 weeks of cloning culture—allogeneic PBMCs from a 9/10 HLA-matched healthy donor (A02:01, A02:01; B18:01, B44:02; C07:01, C05:041; DRB1 11:01, DRB1 13:01; DQB1 03:01, DQB1 06:03) were used as peptide-presenting feeder cells. T-cell cloning culture was supplemented with fresh medium, IL-7 (10 ng/ml), IL-2 (50U/ml), and IL-15 (10 ng/ml) twice per week and peptide-pulsed feeder cells once per week.



Peptide specificity of established clones was evaluated using peptide-pulsed monocytes from a HLA-matched healthy donor. Presenting monocytes had been highly enriched by MACS with  $\alpha$ CD14 microbeads (Miltenyi Biotec; Bergisch-Gladbach, Germany) to prevent donor T-cell contamination. IFN- $\gamma$  production of T-cells clones in response to peptide-presenting monocytes was quantified by routine intracellular FACS staining procedures.

#### Molecular methods

##### RNA extraction, cDNA synthesis

RNA was extracted with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse transcribed using the Superscript III First Strand Synthesis Super Mix (Life Technology, Germany) as recommended by the manufacturer.

##### TCR Va- and V $\beta$ -repertoire spectratyping

TCR repertoire complexity was analyzed by CDR3 size spectratyping in 32 (TCR $\alpha$ ) and 24 (TCR $\beta$ ) PCR reactions as published previously [36]. Amplified PCR products were size-fractionated by capillary gel electrophoresis using the ABI model 3130 Genetic Analyzer, and data analyzed with GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

##### Identification of the epitope-binding region of TCRs from neo-antigen-specific T cells

Single peaks in TCRV $\alpha$ - and V $\beta$ -repertoire spectratype analysis were subjected to direct sequencing approaches for determination of CDR3 amino acid sequences using the BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Germany). Sequences were read in an ABI3130 Genetic Analyzer and matched with IMG, NCBI Blast and Emboss databases.

Furthermore, selected clones were analyzed by flow cytometry for TCRV $\beta$  expression using the IOTest<sup>®</sup> Beta Mark Kit (Beckman Coulter, Germany).

##### Real time PCR

For (quantitative) analysis of cytokine and transcription factor expression, perforin-, granzyme B-, class I-restricted T cell-associated molecule (CRTAM)- and GAPDH-specific primers were used in combination with the SYBR Green kit (Promega, USA) in a BioRad C1000 Thermal cycler/CFX96 real-time System (BioRad, Germany). GAPDH was used as reference gene. Briefly, cDNA was added to a final volume of 10  $\mu$ l/reaction containing 1  $\times$  SYBR Green PCR Master Mix (Promega, USA) and 100 nM of each primer. Thermal cycling conditions were: denaturation at 95  $^{\circ}$ C 10 min, 40 cycles: 95  $^{\circ}$ C/30'', 60  $^{\circ}$ C/30'' and 72  $^{\circ}$ C, 1 min for elongation.

Primer sequences were: CRTAM-for: 5'-CCTCTCAAG ACCACAGCAG-3', CRTAM-rev: 5'-AATGAGGA A-GGACACCAGCG-3', perforin-for, 5'-ACCAGCAAT GTGCATGTGTCTG-3' and perforin-rev: 5'-GGCCC TCTTGAAGTCAGGGT-3' [37], GrzB for: 5'-TTCGTGC TGA-CAGCTGCTCACT-3' and GrzB-rev, 5'-CTCTC-CAGCTGCAGTAGCA-TGA-3' [38], GAPDH-for: 5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3' and GAPDH-rev: 5'-GGCAACAA-TATCCACTTTACCAGACT-3' (RTPrimerDB ID 2053).

### Flow cytometry

Cells were stained according to standard procedures using the following antibodies (clone, manufacturer): PerCP/APC-CD3 (SK7, BD), Vioblue-CD4 (VIT4, Miltenyi Biotec Germany), APC-H7-CD8 $\alpha$  (SK1, BD), FITC/APC-CD62L (LT-TD180, ImmunoTools), APC-CD25 (2A3, BD Pharmingen), PE-CF594-A-CCR7 (150503, BD), CD45RO, PE-Cy7-CD45RA (H/100, BD), CD27, UV1-A-CD25, APC-CD69 (FN50, Biolegend), CD276, UV3-CD28, CD95. Intracellular fixation/permeabilization kit (eBioscience) and Brilliant-Violet 785-TNF- $\alpha$  (Mab11), PE-IFN- $\gamma$  (B27) were used for intracellular cytokine staining according to the manufacturer's instructions. Dead cells were excluded via Alexa Fluor 350 (Invitrogen) or via Zombie Aqua<sup>TM</sup> (Biolegend). PBMCs were pretreated with FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations. Samples were analyzed on a LSR II or FACS Canto II with FACS Diva software (BD Biosciences).

### Statistical analysis

Data were analyzed with Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc) and Student's t test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Patient data, vaccine application and clinical outcome

After receiving state-of-the-art oncological treatment for primary and relapsed pancreatic carcinoma, immunotherapeutic interventions were initiated in July 2013 when routine staging (sonography, CT-scan, MRI) did not show any residual tumor, neither at the primary nor at the metastatic site (second complete remission). The tumor was found to be positive for CA19-9 and blood levels correlated with the disease course. CA19-9 levels have remained within normal ranges since March 2013. Chemotherapy was terminated 27 months after disease onset (Fig. 1). Currently, 64 months after initial diagnosis and 43 months after initialization of vaccine therapy, the patient is in good health and fully active (ECOG 0). The latest routine examination (physical examination and laboratory test in March 2017, CT in Jun 2016 and

sonography in November 2016) showed no evidence of disease.

### Overall TCR repertoire complexity increases during vaccination

TCRV $\alpha$  and V $\beta$ -chain repertoires of the unmanipulated peripheral T-cell pool at *IM1* showed a reduced complexity most likely as a consequence of long-term chemotherapy. Numerous families in both the TCRV $\alpha$  and V $\beta$  chain repertoires, exhibited profound skewing indicating limited diversity and clonal expansions. Accordingly, TCRV $\alpha$  8-1, 14DV4, 21, 30, and TCRV $\beta$  6-5, 12-3, 21-1 sequences—obtained by direct sequencing of singular peaks (Additional file 2: Fig. S2)—showed CDR3 motifs similar to published TCRs specific for CMV (TCRV $\alpha$  8-1, 30, TCRV $\beta$  12-3, 21-1) (Table 2) and mycolic acid (TCRV $\beta$  6-5) (a cell wall component of several bacteria including mycobacterium tuberculosis) and thus can be regarded as public TCR motifs [39–41].

Since the patient had no documented infection with CMV or mycobacteriaceae at that time, detection of these public TCRs rather reflects past infectious episodes with these microorganisms, which become more prominent with increasing age and under lymphodepleting chemotherapy [42]. The overall complexity of the TCRV $\alpha$  and V $\beta$  chain repertoires slightly increased over time after cessation of Folflirinox (Fig. 3).

### Detection of vaccine-reactive T cells at *IM1*

To test whether the priming phase of the vaccine has resulted in a detectable vaccine-reactive T-cell response, PBMCs drawn 28 weeks after initiation of vaccination (i.e. after 8 vaccines) were cultivated ex vivo in the presence of vaccine peptides and low dose IL-2, in the absence of a mitogen. Such limiting growth conditions only activate and expand memory T cells since memory T cells have an increased sensitivity for TCR stimulation, are more sensitive to low doses of antigen and have an increased proliferative potential even without excessive support of cytokines [43]. Moreover, the number of mature dendritic cells that is necessary to efficiently stimulate and prime naïve T cells in context with costimulatory molecules is low in PBMCs thus naïve T cells get stimulated simply with their cognate antigen alone, which makes them refractory to further stimulus, hyporesponsive and anergic [44, 45]. Thus the short term culture protocol impedes in vitro priming of naïve T cells, which could lead to false positive results. After expansion and restimulation, a total of 1.6% of T cells were responsive to the peptide pool with IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> production, indicating a peptide-specific response (Fig. 4a). Interestingly, the majority of responding T cells were CD4<sup>+</sup> (67.5%), the remaining CD8<sup>+</sup> (19.7%) or double negative (Fig. 4a).

**Table 2 CDR3 sequences before short term culture and CMV specific CDR3 sequences**

Before short term culture														
TCR α chain					TCR β chain									
Seq. ID	Vα <sub>family</sub>	Jα <sub>segm.</sub>	Vα <sub>seq</sub>	CDR3 <sub>seq</sub>	Jα <sub>seq</sub>	Public motif according to reference	Seq. ID	Vβ <sub>family</sub>	Dβ <sub>segm.</sub>	Jβ <sub>segm.</sub>	Vβ <sub>seq</sub>	CDR3 <sub>seq</sub>	Jβ <sub>seq</sub>	Public motif according to reference
1 <sup>st</sup> IM	1	8-1	40	CAV	KTG	GTYYKIF PMID:19017975	5	6-5	D1	2-7	CASS	EDRD	YEQYF	
	2	14DV4	36	CAMRE	G	TGANNLFF	6	12-3	-	1-5	CASS	PNY	SNQPOHF PMID:21555537	
	3	21	44	CAV	TRT	GTASKLTF	7	21-1	D2	1-2	CASS	TRG	YGYTF PMID:19017975, 23267020	
	4	30	40	CGTE	IVG	GTYYKIF PMID:24711416	8	27-1	D1	2-7	CASSF	TLAG	EQYF	
2 <sup>nd</sup> IM	9	8-1	40	CAV	KTG	GTYYKIF PMID:19017975	13	6-5	D1	2-7	CASS	EDRD	YEQYF	
	10	14DV4	36	CAMRE	G	TGANNLFF	14	12-3	-	1-5	CASS	PNY	SNQPOHF PMID:21555537	
	11	21	44	CAV	TRT	GTASKLTF	15	21-1	D2	1-2	CASS	TRG	YGYTF PMID:19017975, 23267020	
	12	30	40	GTE	IVG	GTYYKIF PMID:24711416								
3 <sup>rd</sup> IM	17	8-1	40	CAV	KTG	GTYYKIF PMID:19017975	21	2	D2	2-4	CASS	SPDYS	KNIQYF	
	18	14DV4	36	CAMRE	G	TGANNLFF	22	6-5	D1	2-7	CASS	EDRD	YEQYF	
	19	21	44	CAV	TRT	GTASKLTF	23	12-3	-	1-5	CASS	PNY	SNQPOHF PMID:21555537	
	20	30	40	GTE	IVG	GTYYKIF PMID:24711416	24	21-1	D2	1-2	CASS	TRG	YGYTF PMID:19017975, 23267020	
							25	25-1	D2	2-5	CASSE	RGF	QETQYF	
							26	27-1	D1	2-7	CASSF	TLAG	EQYF	

CMV specific CDR3 sequences									
Vβ <sub>family</sub>	Jβ <sub>segm.</sub>	Vβ <sub>seq</sub>	CDR3 <sub>seq</sub>	Jβ <sub>seq</sub>	MHC allele for isolation	Antigen protein	Antigen peptide	Reference	
1*	27	2-1	CASS	KTGGSP	YNEQFF	A*02:01	pp65	NLVPMVATV PMID:19017975	
2*	ND	1-2	CASSL	GGSPNYGYTF		B*07:02	pp65	TPRVTGGGAM PMID:21555537	
3a*	2	1-1	CA	NTRGE	NTEAFF	A*02:01	pp65	NLVPMVATV PMID:19017975	
3b*	2-4	2-1	CAS	GRGTGTRGR	NEQFF	B*07	pp65	TPRVTGGGAM PMID:23267020	
4*	12-3, 12-4	2-2	CAS	AIVG	ELFF	A*02:01	pp65	NLVPMVATV PMID:24711416	

CDR3 sequences obtained by direct sequencing of dominant, singular peaks in CDR3 size spectratyping of peripheral T cells that seemed to dominate the TCR repertoire without prior stimulation of expansion. Public, CMV-specific CDR3 sequences published previously by Zvyagin et al. are marked in grey [39]

**Vaccine peptides contribute differently to the T-cell response, IM2**

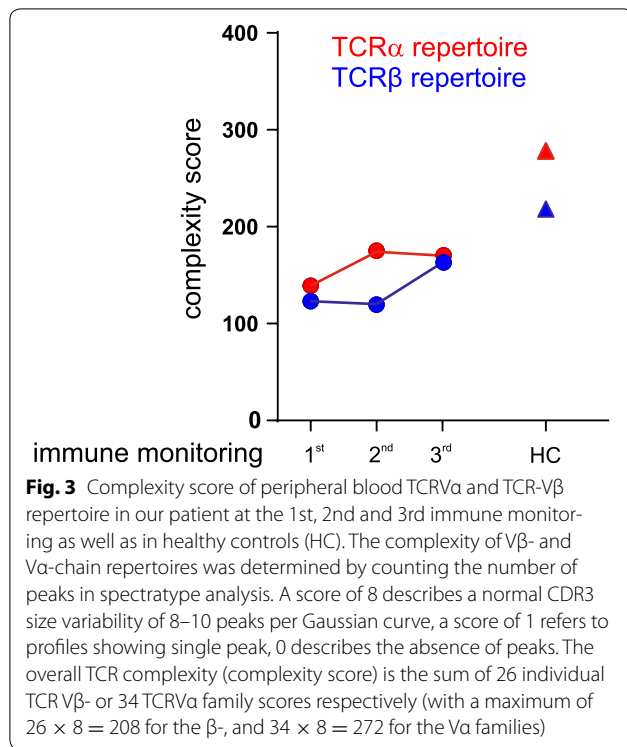
Immune monitoring at time point IM2 (44 weeks after initial vaccination) was designed to discriminate how the 4 vaccine peptides contributed to the induced T-cell response. This time, PBMCs were stimulated with every single peptide in short term pre-cultures separately. Peptide 1 boosted the biggest share of IFN-γ<sup>+</sup> T cells (0.3% IFN-γ<sup>+</sup> cells/CD3<sup>+</sup>), followed by peptide 2 (0.2% IFN-γ<sup>+</sup> cells/CD3<sup>+</sup>), whereas peptide 3 and 4 showed responses only around the background level (each 0.1% IFN-γ<sup>+</sup> cells/CD3<sup>+</sup>) (Fig. 4b). This demonstrates that vaccine peptides were able to induce specific T-cell immunity yet quantitatively differed in their ability. Of note, peptides 1 and 2 had higher SYFPEITHI scores for HLA A\*02:01 and B\*44:02 than peptides 3 and 4 (Table 1). Only peptide 2 was also predicted as a binder for HLA DRB1\*1101 and HLA DRB1\*1301 (Table 1). Again, IFN-γ<sup>+</sup> T cells were largely CD4<sup>+</sup> dominated except for peptide 1 responding T cells, which—quite unexpectedly—were mostly (70%) CD4-/CD8-double negative (DN) T cells. γδ T cells—T cells that belong to innate immunity—lack a coreceptor and without the restriction for HLA presentation can directly respond to epitopes in proteins in either three dimensional as well as linear unfolded form, and also to soluble proteins or small peptide antigens [46]. Intriguingly, the Tetanus toxin-derived peptide *Clostridium tetani*<sub>1235-1246</sub> (GNAFNNLDRLLR), for which γδ TCR-dependent responses have been reported [47], shares a 3

amino acid motif with the vaccine peptide WEAKSPRIL. This motif length is sufficient in size to provoke a TCR mediated γδ T cell peptide response [48]. Therefore it is legitimate to assume that the DN T cells responding to peptides are γδ T cells.

**Molecular characterization of peptide-specific T cells, IM1-3**

In order to molecularly characterize the T-cell response against the vaccine on the CDR3 sequence level, we purified IFN-γ-responsive T-cells from IM1 and IM2 after expansion and restimulation in short-term culture via an IFN-γ-capture assay. These putatively peptide-specific T cells were then subject to CDR3 size spectratyping, direct sequencing of prominent peaks and bioinformatic data analysis. Since the genetic material obtained in this way was very limited and precluded more *in-depth* analyzes, at IM3 we generated T-cell clones against the 4 peptides using pre-clonal stimulation, IFN-γ-capture, limiting dilution and subsequent clonal expansion. Peptide 1 fostered 19 clones, peptide 2 8 clones, peptide 3 1 clone, no clone could be obtained with peptide 4. Vaccine-peptide specific clones were cultivated for another 3 weeks to obtain sufficient numbers for further analysis. Finally, 10 clones could be harvested in sufficient numbers for further analysis (Table 3 lower panel).

T-cell clones were exclusively CD4<sup>+</sup> (Fig. 4c), enriched for IFN-γ responsiveness upon restimulation with the cognate peptide (Fig. 4c, d) and yielded unequivocally singular peaks in CDR3 size spectratypes (not shown).



Phenotypically, T-cell clones expressed high levels of activation markers such as CD25, CD69, and HLA-DR (Additional file 3: Fig. S3), and higher mRNA levels of granzymeB, perforin, and CRTAM—that determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage [49]—than clones established in control cultures without peptide (Fig. 4e). Interestingly, the vast majority of T-cell clones in control cultures carried the identical public TCR  $\alpha$ 39  $\beta$ 6-2, known to be specific for mycolic acid [41], (Additional file 4: Fig. S4), suggesting a high precursor frequency in peripheral blood and a significant survival advantage for these T-cells under the given culture conditions. Vaccine-peptide specific T cells were negative for Foxp3 and displayed a terminally differentiated effector T cell phenotype ( $T_{EMRA}$ ,  $CCR7^-$ ,  $CD45RA^+$ ) (Additional file 5: Figure S5a) [50]. In contrast, clones obtained from control cultures without peptide exhibited an effector memory phenotype ( $CD45RO^+$ ,  $CD45RA^-$ ,  $CD62L^-$ ,  $CCR7^-$ ,  $CD27^-$ ) (Additional file 5: Figure S5b).

The epitope-binding CDR3 regions of the identified TCRs were of rather short length (median of 3 N-nucleotides, Table 3) and positively charged with the exception of TCRs reactive to peptide 1. We were able to identify two TCR sequences, with *identical* TCR $\alpha$ - and TCR $\beta$ -derived CDR3 sequences at two time points indicating persistence of vaccine-specific T-cell responses: TCR $\beta$ 18 bearing seqID 68 (*IM2*) and clone 17 (*IM3*), as well as TCR $\beta$ 14 bearing seqID 69 (*IM2*) and clone 42 (*IM3*). TCRs that share a common intermediate segment of the CDR3 sequence yet are flanked by different V- and J-gene segments are termed convergent CDR3 formations. Two *convergent* CDR3 formations could be detected at least at two sequential time points: seqID 31 (*IM1*) and seqID 46 (*IM2*), as well as seqID 44 (*IM2*) and clone 42 (*IM3*), again indicating clonal persistence. Whereas the two convergent TCR $\alpha$  sequences were most likely stimulated by peptide 1, the two identical CDR3 sequences unexpectedly were stimulated by peptide 3 in *IM2* and by peptide 1 and 2 in *IM3*. Peptides 1 and 3 are clearly different, yet are both predicted to bind to HLA-B44 and show identical amino acids in anchor positions 2 (E) and 7 (R) [34]. Hydrophobic peptides 2 and 3 both bind to CD1d. Peptides 1 and 2 with the highest SYFPEITHI scores and NetMHCIIpan predictions induced most of the detectable CDR3 sequences and the highest number of clones (Table 1).

Three germline encoded CDR3 sequences (i.e. recombination of VD(J) gene segments without addition of N-nucleotides) were identified in peptide 2 (Seq. ID 46, 50) and peptide 1 (Seq. ID 44) (Table 3) pulsed cultures.

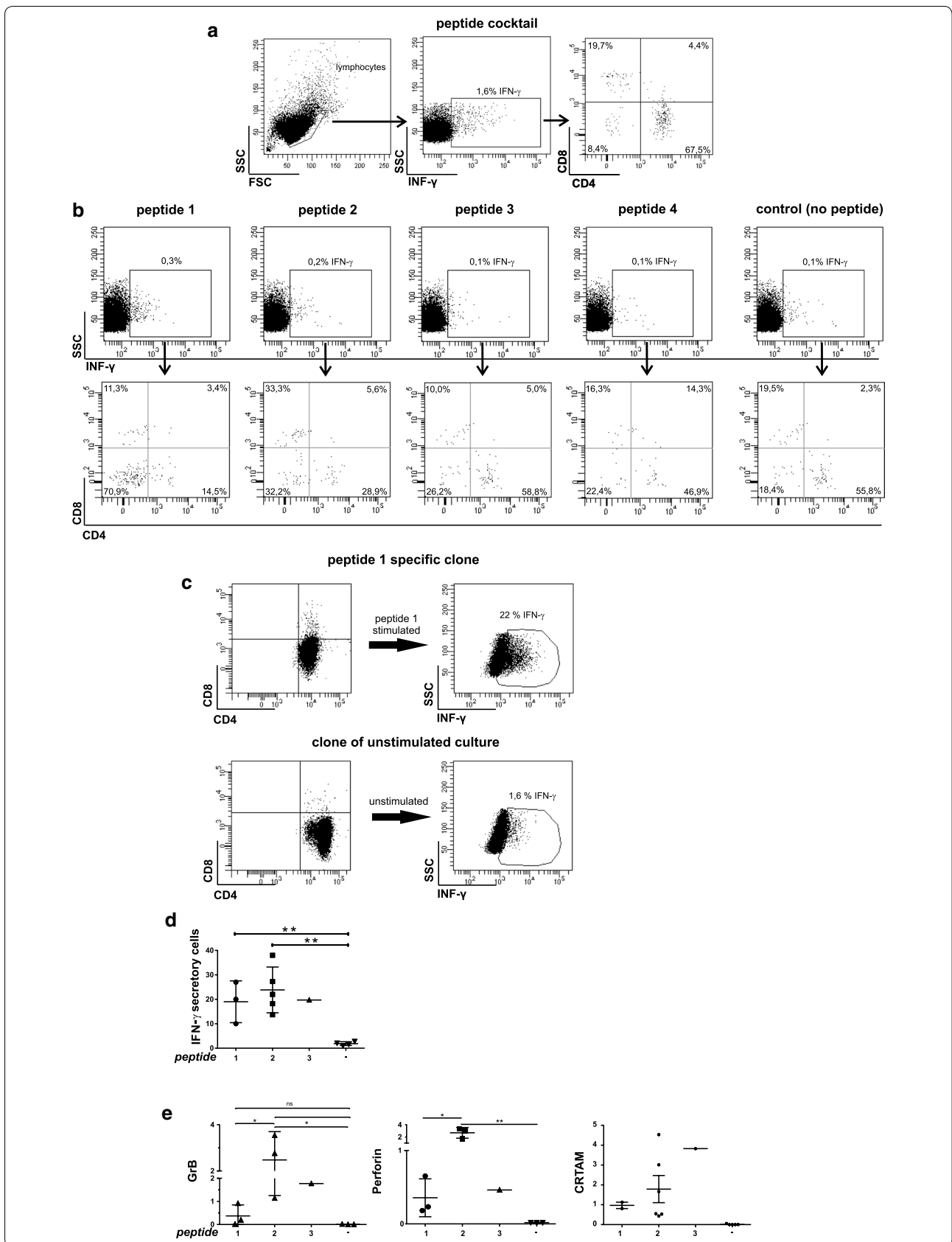
Three of four clones (35, 36, and 54) specific for peptide 1 expressed two TCR $\alpha$  chains combined with one TCR $\beta$  chain, respectively (Table 3), whereas peptide 2 stimulated five clones with singular TCR $\alpha$  and  $\beta$  chains.

## Discussion

Identification of peptide-reactive T cells within the huge repertoire of existing TCR sequences of a human individual remains a major challenge. NGS approaches have significantly improved the sensitivity of clonality assays, e.g. in monitoring of minimal residual disease of lymphoid malignancies [51] or in tracking of known sequences of

(See figure on next page.)

**Fig. 4** Ex vivo peptide stimulation assays of T cells. T cells were pulsed with peptide, expanded and restimulated in short-term in vitro culture. Cells were gated on live-cells, lymphocytic fraction,  $CD3^+$  cells. **a** At *IM1*, IFN- $\gamma$  secretion of T cells was measured after stimulation with a peptide cocktail containing all four peptides 4. **b** At *IM2*, T cells were stimulated with single peptides, including a no-peptide control, respectively. **c** IFN- $\gamma$ -secretion and phenotype of a T-cell clone (#33) responsive to peptide 1 obtained from peripheral T cells at *IM3*. **d** Percentage of cells from clonal populations of defined specificity responding to their peptide with IFN- $\gamma^+$  production. **e** mRNA expression of granzymeB, perforin and CRTAM in peptide-specific clones from *IM3* measured by RT-PCR. Expression of the target gene was normalized to expression of human GAPDH. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$



**Table 3 TCR $\alpha$  and - $\beta$  CDR3 sequences of peptide-specific T cells at IM1, IM2 and IM3**

TCR $\alpha$ chain										TCR $\beta$ chain									
1 <sup>st</sup> IM																			
TCR $\alpha$ and TCR $\beta$ sequences of T cells responding to peptide cocktail pulse with IFN- $\gamma$ release																			
Pulsed with	Seq. ID	V $\alpha$	J $\alpha$	V $\alpha$	CDR3seq		J $\alpha$	Public motif according to reference	Seq. ID	V $\beta$	D $\beta$	J $\beta_1$	V $\beta$	CDR3seq		J $\beta$	Public motif according to reference		
					N								N		J $\beta$				
Peptide 1-4	IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells	27	6	31	CAL	W	NNNARLMF		32	21-1	2	1-2	CASS	TRG	YGTYF				
		28	10	52	CVV	RK	TF		33	30	D1	2-7	CAWS	AGTD	YEQYF				
		29	12-2	52	CAV	RK	AGGTSYKGL	i	34	25-1	D2	2-1	CASS	AGGPG	FFGPG				
		30	21	9	CAV	RGP	GFKTIFGA		35	24-1	D2	2-3	CATSD	FPSGV	TQYF				
		31	26-1	20	CV	RVMG	SNDYKLSF												
Peptide 1-4	IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells	31	35	48	CAG	RD	NFGNEKLTf												
		36	8-1	40	CAV	KTG	GTyKYIF	PMD:19017975	40	6-5	D1	2-7	CASS	EDRD	YEQYF				
		37	14DV4	36	CAMRE	G	TGANNLFF		41	12-3	-	1-5	CASS	PNY	SNQPQHF	PMD:2155537 PMD:19017975, PMD:23267020			
		38	20	22	CAV	VKGG	GSARQLTF		42	21-1	2	1-2	CASS	TRG	YGTYF				
		39	30	40	CGTE	IVG	GTyKYIF	PMD:24711416	43	27-1	D1	2-7	CASSf	TLAG	EQYF				
2 <sup>nd</sup> IM																			
TCR $\alpha$ and TCR $\beta$ sequences of T cells responding to single peptide pulse with IFN- $\gamma$ release																			
Pulsed with	Seq. ID	V $\alpha$	J $\alpha$	V $\alpha$	CDR3seq		J $\alpha$	Seq. ID	V $\beta$	D $\beta$	J $\beta_1$	V $\beta$	CDR3seq		J $\beta$				
					N								N		J $\beta$				
Peptide 1	IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells	44	34	42	CGA	D	GSQGNLIF	58	12-3	D2	2-1	CASS	RTRVR	NEOFF					
		45	5	35	CA	ESIS	FGNVLHC	59	7-2	D2	2-7	CASSL	ALRRD	EQYF					
		46	21	12	CAV	RD	SSYKLIF	60	5-4	D1	2-3	CASSL	GQGT	TDQYF					
		47	35	49	CAG	RL	GTGNQFYF	61	12-3	D2	2-1	CASS	RTRVR	NEOFF					
		48	12-1	13	CVV	TGPGG	GYQKVTF	62	18	D1	2-7	CASSP	GTGP	YEQYF					
Peptide 2	IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells	49	14DV4	34	CAM	RAY	TDKLIF	63	20	D2	2-7	CSA	LRRGL	SYEQYF					
		50	8-4	44	CAV	S	GTASKLTLV	64	27	1	2-7	CASS	FGQF	YEQYF					
		51	14DV4	34	CAM	RAY	TDKLIF	65	28	D2	2-7	CASS	FHGTDKG	QYF					
Peptide 3	IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells	52	8-4	-	CAV	HG	polyklonal	66	29	D1	1-1	CS	ALETGP	EAFf					
		53	27	32	CAG	GG	TNKLIF	67	7	D1	2-6	CASSL	GD	NEOFF					
		54	21	44	CAV	TRT	GTASKLTF	68	18	D2	1-2	CASS	DGA	NYGYTF					
Peptide 4	IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells	55	10	14	CVV	SH	SNSGYALNF	69	14	-	2-6	CASSQ	GW	SGANLTF					
		56	21	57	CAV	ISR	GSSEKLVF												
3 <sup>rd</sup> IM																			
Individual TCR heterodimers																			
Clones specific for	clone ID	V $\alpha$	J $\alpha$	V $\alpha$	CDR3seq		J $\alpha$	V $\beta$	D $\beta$	J $\beta_1$	V $\beta$	CDR3seq		J $\beta$					
					N							N		J $\beta$					
Peptide 1	dual TCRs	42	9-2	45	CALS	D	3GGADGLTF	14	-	2-6	CASSQ	GW	SGANLTF						
		35	26-1	12	CVR	SRLT	MDSSYKLIF	30	D2	2-5	CAWS	LIGRP	QEQYF						
		29DV5	22	CAAS	AVR	SSGSARQLTF	30	D2	2-5	CAWS	LIGRP	QEQYF							
		36	26-1	12	CVR	SRLT	MDSSYKLIF	30	D2	2-5	CAWS	LIGRP	QEQYF						
		54	29DV5	22	CAAS	AVR	SSGSARQLTF	30	D2	2-5	CAWS	LIGRP	QEQYF						
Peptide 2	dual TCRs	14	8-3	22	CAVG	AR	GSARQLTF	9	D2	2-1	CASS	GGOAS	SYNEOFF						
		15	14DV4	15	CAMRE	GYG	QAQTALIF	D2	2-3	CASSV	ARGT	STDQYF							
		16	23VD6	53	CAAS	RG	3GGSNYKLTF	12-2	D1	2-2	CAS	NPKGWA	GELFF						
		17	22	23	CAVE	GW	GKGLIF	18	D2	1-2	CASS	DGA	NYGYTF						
		34	29DV5	45	CAAS			25	D1	1-5	CASSE	SGTGK	PQHF						
Peptide 3		37	8-3	22	CAVG	AR	GSARQLTF	9	D2	2-1	CASS	GGOAS	SYNEOFF						

Vertical brackets mark identical ("i") or convergent CDR3 formation ("c"), the latter resulting from combination of different variable and joining regions but identical N nucleotides coding for the same amino acids

Seq sequence; yellow germline encoded, pink dual TCR(2 Va chains, 1 V $\beta$  chain), red information of clone IDs but NOT sequence IDs

\*Amino acids in the "N" region position in these CDR3 sequences are germline encoded. CDR3 sequences from IFN- $\gamma$ <sup>ne9</sup> cell fraction of IM1 were identical with CDR3 sequences identified before immune monitoring 1, 2 and 3 (Table 2). CMV specific sequences are marked in grey

hypervariable regions. High-throughput sequencing may allow a better estimation of the actual frequency and redundancy of T-cell clonotypes, however, it is not suitable for deciphering vaccine-induced T-cell responses. Monitoring of immune responses after vaccination requires the correlation of identified TCR sequences with their specificity [52]. Moreover, more in depth

analyses of peptide-reactive T cells such as the determination of TCRV $\alpha$ - and V $\beta$ -chain pairing, potential dual TCR expression, phenotypic characterization of markers such as Foxp3 or CRTAM which distinguish different functional states of T cells is not possible by using NGS approaches alone. In order to circumvent these limitations of large scale, non-supervised TCR sequencing, we

focused on tracking defined T-cell responses against neoepitope peptides after short pre-culture and expansion of patient PBMCs in the presence of vaccine peptides, a standard procedure used for the detection of epitope specific T cells [53]. Only T cells responding to the peptide stimulus with IFN- $\gamma$  release were isolated and used for further examination. By relying on IFN- $\gamma$  production in response to a stimulus we could ascertain the specificity of these T cells, their functionality and T<sub>H</sub>1 phenotype. The separation of the peptide-reactive from non-specific background T cells allowed the enumeration of unique TCRV $\alpha$  and -V $\beta$  sequences, an estimation on the diversity of induced TCR sequences, and tracking of clonal persistence over time. The technique of IFN- $\gamma$  -capture assays is widely used for isolation and transfer of antigen-specific immunity, and T-cells sorted according to their IFN- $\gamma$  secretion have demonstrated to be highly specific and functional, even in the clinical setting [54].

Our results demonstrated a discernible TCR-repertoire responsive to the vaccine peptides. Besides a consistency of the IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TCR repertoire in terms of net charge we detected two identical and two convergent CDR3 sequences at more than 1 time point, prodding persistent, vaccine-specific immunity. Furthermore, formation of convergent sequences against a common target could indicate strong immunogenicity of these neoepitope-derived peptides and indeed, three of these repetitive sequences could be attributed to the same peptide motif. However, one identical sequence was found in T cells reactive for peptide 1 (RMI1 mutation) and peptide 3 (KIF4B mutation). Whether sharing of the same presenting MHC molecule (HLA-B\*44) or identical amino acids at anchor positions 2 and 7 contributed to this observation remains unclear. In general, broadness and diversity of peptide-reactive repertoires seemed to correspond with the MHC class I binding affinity based on SYFPEI-THI scores [34]: strong binder peptides 1 and 2 yielded more CDR3 sequences than weak binder peptides 3 and 4. Whether peptide presentation via CD1d (binds hydrophobic peptides with hydrophobic amino acids at anchor positions 1-4-7) [55] played a role for peptides 2 and 3 presentation was not assessed in our assays. In addition, only peptide 2 was also predicted as a weak binder for both of the patient's HLA DRB MHC class II molecules (Table 1). This likelihood for being presented by HLA class I and II and CD1d goes well with the broadest TCR repertoire and a persistent CDR3 sequence motif induced by peptide 2.

The majority of identified T cells expressed single TCRV $\alpha$ - and -V $\beta$  chains. Moreover, at IM3 we could identify a neo-antigen specific dual TCR, consisting of two alpha chains paired with one beta chain, in three clones. A dual TCR is able to bind two specificities, of

which one possibly has not undergone thymic selection [56]. Dual TCRs account for up to 30% of the normal T-cell repertoire in humans [57, 58] and in mice [59–62], and are regarded as rather beneficial for the host since they may help to generate more vigorous responses to problematic antigens [63]. Dual TCRs can endow T cells with an intrinsic property for alloreactivity but do not necessarily confer increased susceptibility for autoimmunity [64]. Interestingly, dual TCRs have been described as one of two possible mechanisms by which CD4<sup>+</sup> T cells expressing a nominally MHC class I-restricted TCR can develop [65]. As a matter of fact, although class I restricted peptides were used in this study, the vaccine-responsive T cells were mainly CD4<sup>+</sup> and expressed CRTAM whose intracellular signaling is required for the induction of CD4<sup>+</sup> CTLs [49]. CRTAM<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells have been described to possess characteristics of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, secrete IFN- $\gamma$ , exhibit a CTL-related gene signature, such as eomesodermin (Eomes), granzymeB, and perforin, and traffic to sites of inflammation [49]. Thus, our data indicate that CD4<sup>+</sup> CTLs may play a role in vaccine-induced TCR repertoires, a finding that warrants further investigation in other vaccine settings as well as in preclinical models.

From a clinical perspective, the patient continues to show a remarkable long complete remission after standard therapy for a metastasized pancreatic ductal carcinoma. Since the patient was already in second complete remission when the neoepitope-derived vaccine was initiated, we cannot draw definite conclusions whether and to what extent the induced tumor-specific immune response contributed to long-term survival. Of note, induction of the immune response and the ongoing remission was achieved without adverse events from the vaccine, a frequent finding with therapeutic vaccines. In contrast, checkpoint inhibitors like CTLA-4 or PD-L1, which may boost but cannot induce anti-tumor immune responses, are frequently associated with significant adverse events, which can be dose limiting [66]. The important question, whether checkpoint blockade could enhance vaccine-induced immune responses has to be addressed in further clinical trials.

## Conclusions

We report a remarkable long-term remission in a patient with advanced pancreatic cancer, who received an individualized four peptide vaccine based on in silico predicted peptide motifs from the two sole mutations in his cancer, i.e. in the proteins RMI1 and KIF4B. Moderate to strong cytoplasmic and/or nuclear expression of these proteins has been documented in pancreatic cancer before [67]. Three of the four peptides elicited detectable IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CTL responses which were CD4<sup>+</sup>



dominated. On the molecular level, both transient and persistent peptide-specific TCR CDR3 sequences could be identified. Our data show that an individualized, neoepitope-derived therapeutic vaccine is able to induce a tumor-specific immune response with a traceable molecular signature. This detailed immune monitoring program covering functional and molecular aspects of T-cell biology provides deepened insight into the mechanisms driving cancer vaccine responses and emphasizes the potential of personalized vaccines as a promising therapeutic strategy in maintaining long-term remissions, which have to be tested in controlled clinical trials.

## Additional files

**Additional file 1: Figure S1.** Work flow of immune monitoring techniques.

**Additional file 2: Figure S2.** Activation markers expressed by vaccine-reactive T cell clones at IM3. T cells responding to vaccine peptide stimulation with IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> production were analyzed for their expression of the activation markers CD25, CD69 and HLA-DR by flow cytometry.

**Additional file 3: Figure S3.** Spectratype analysis of patient PBMCs without prior short term culture. TCR repertoire analysis including 34 TCR $\alpha$  and 24 TCR $\beta$  families. Numbers indicate CDR3 sequencing data gained in direct sequencing approaches (see Table 3). Peak numbers marked in grey harbor CMV-specific sequences.

**Additional file 4: Figure S4.** Clonality analysis of 21 control cultures (without peptide stimulation) at IM3 was performed by flow cytometry. All control clones were found to express all the same TCRV $\beta$  chain (BV 6-2), confirming molecular data, indicating a common, high-frequency progenitor in peripheral blood. (a) shows representative flow cytometry data of clone #6. Individual TCR $\beta$  antibody staining are achieved by combining 3 TCR V $\beta$ -specific reagents in a single test using only two colors for mab conjugation: one TCR V $\beta$  antibody is conjugated to FITC, another one to PE, and the third to both FITC and PE. In this way, the third V $\beta$ -stained population shows up in the diagonal of the upper right quadrant in a FL1/FL2 histogram. The CDR3 sequence of the analyzed clone (b) is identical to a TCR sequence specific for mycolic acid [41].

**Additional file 5: Figure S5.** Peptide-responsive clones at IM3 all displayed a CD45RA<sup>+</sup> effector memory T<sub>EMRA</sub> phenotype. One representative example (clone #54) is shown in (a). In contrast, clones obtained from control cultures without peptide stimulation expressed a CD45RA<sup>neg</sup> effector memory phenotype, data by clone #6 are shown in (b).

## Authors' contributions

KS isolated T cells from peripheral blood, cultivated, stimulated, cloned and analyzed T cells on molecular level and via FACS analysis, HH contributed to intracellular FACS analysis, and helped writing the manuscript, ME major contribution to format and clearness of the manuscript, MM, MS, DD, FB, SB performed NGS, analyzed NGS data, designed peptides, CC provided patient history, HL head of department Klinikum Garmisch/Partenkirchen, applied vaccine therapy, RH contributed to experimental design, KS concept of the study, wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Author details

<sup>1</sup> Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Children's Hospital Tübingen, Hoppe-Seyler Street 1, 72076 Tübingen, Germany.

<sup>2</sup> Department of Pediatric Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation, University Medical Center Würzburg, Josef-Schneider Street 2, 97080 Würzburg, Germany. <sup>3</sup> Center for Genomics and Transcriptomics (CeGaT) GmbH and Practice for Human Genetics, Paul-Ehrlich-Straße 23,

72076 Tübingen, Germany. <sup>4</sup> Institute for Medical and Human Genetics, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. <sup>5</sup> Folkhälsan Institute of Genetics, Haartmaninkatu 8, 00014 Helsinki, Finland. <sup>6</sup> Klinikum Garmisch-Partenkirchen GmbH, Zentrum für Innere Medizin, 82467 Garmisch-Partenkirchen, Germany. <sup>7</sup> University Children's Hospital, University Medical Center Tübingen, Hoppe-Seyler-Street 1, 72076 Tübingen, Germany.

## Acknowledgements

Not applicable.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

## Consent for publication

Written consent for publication was obtained from the patients.

## Ethics approval and consent to participate

The Institutional Review Board at the University Tuebingen Children's Hospital approved the study, and informed consent had been obtained before the study.

## Funding

KS was supported by a grant provided by the Jürgen Manchot Foundation. HH was supported by a grant provided by the Stefan Morsch Foundation.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 14 November 2017 Accepted: 10 January 2018

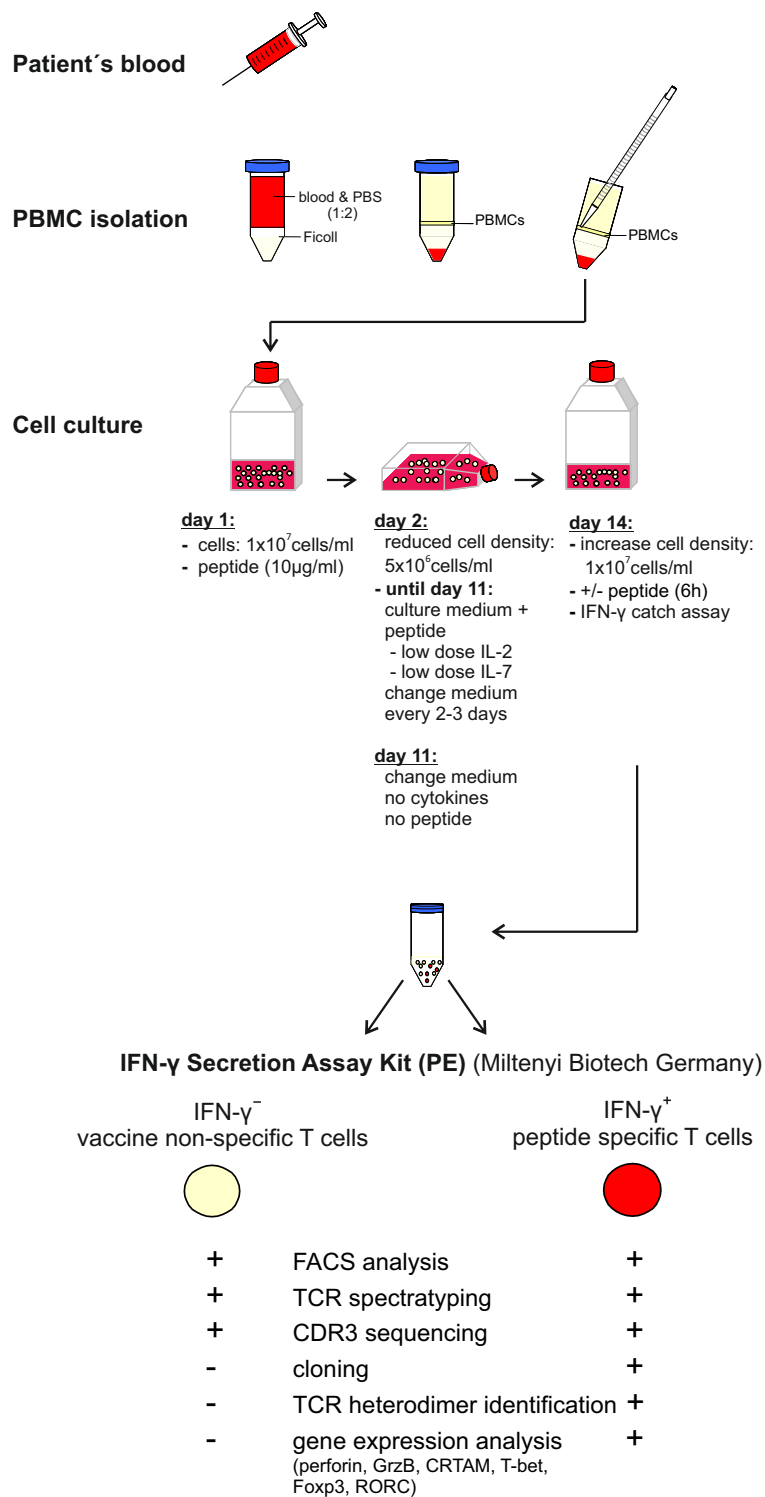
Published online: 06 February 2018

## References

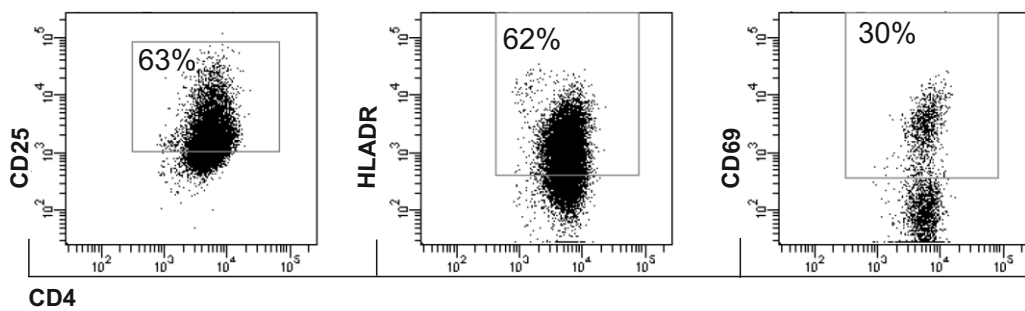
- Wellner UF, et al. Locally advanced pancreatic head cancer: margin-positive resection or bypass? *ISRN Surg.* 2012;2012:513241.
- Assifi MM, et al. Neoadjuvant therapy in pancreatic adenocarcinoma: a meta-analysis of phase II trials. *Surgery.* 2011;150(3):466–73.
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer facts and figures 2013. *CA Cancer J Clin.* 2012;63:11–30.
- Bose D, Katz MHG, Fleming JB. Pancreatic Adenocarcinoma. In: Feig BW, Ching CD, editors. *M.D. Anderson surgical oncology handbook*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2012. p. 472–490.
- Aranda F, et al. Trial Watch: peptide vaccines in cancer therapy. *Oncoimmunology.* 2013;2(12):e26621.
- Guo C, et al. Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future. *Adv Cancer Res.* 2013;119:421–75.
- Dodson LF, Hawkins WG, Goedegebuure P. Potential targets for pancreatic cancer immunotherapeutics. *Immunotherapy.* 2011;3(4):517–37.
- Schmitz-Winnenthal FH, et al. High frequencies of functional tumor-reactive T cells in bone marrow and blood of pancreatic cancer patients. *Cancer Res.* 2005;65(21):10079–87.
- Fukunaga A, et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas.* 2004;28(1):e26–31.
- Kunk PR, et al. From bench to bedside a comprehensive review of pancreatic cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2016;4:14.
- Constantino J, et al. Antitumor dendritic cell-based vaccines: lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. *Transl Res.* 2016;168:74–95.
- Yadav DK, de Lu C, Yadav RK. Vaccine therapy for pancreatic cancer: a battle against deadly cancer. *Cancer Sci Ther.* 2014;6:268–77.

13. Salman B, et al. Vaccine therapy for pancreatic cancer. *Oncoimmunology*. 2013;2(12):e26662.
14. Soares KC, et al. Vaccines for pancreatic cancer. *Cancer J*. 2012;18(6):642–52.
15. Palena C, et al. Cancer vaccines: preclinical studies and novel strategies. *Adv Cancer Res*. 2006;95:115–45.
16. Cheever MA, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res*. 2009;15(17):5323–37.
17. Kroemer G, Zitvogel L. Can the exome and the immunome converge on the design of efficient cancer vaccines? *Oncoimmunology*. 2012;1(5):579–80.
18. Gilboa E. The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity*. 1999;11(3):263–70.
19. Castle JC, et al. Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res*. 2012;72(5):1081–91.
20. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):265–77.
21. Small EJ, et al. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol*. 2000;18(23):3894–903.
22. Kaufman HL, et al. Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma. *J Immunother Cancer*. 2014;2:11.
23. Pol J, et al. Trial watch: immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy. *Oncoimmunology*. 2015;4(4):e1008866.
24. Conroy T, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011;364(19):1817–25.
25. Gourgou-Bourgade S, et al. Impact of FOLFIRINOX compared with gemcitabine on quality of life in patients with metastatic pancreatic cancer: results from the PRODIGE 4/ACCORD 11 randomized trial. *J Clin Oncol*. 2013;31(1):23–9.
26. Vacchelli E, et al. Current trends of anticancer immunochemotherapy. *Oncoimmunology*. 2013;2(6):e25396.
27. Galluzzi L, et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*. 2014;5(24):12472–508.
28. Lesterhuis WJ, et al. Platinum-based drugs disrupt STAT6-mediated suppression of immune responses against cancer in humans and mice. *J Clin Invest*. 2011;121(8):3100–8.
29. Pasquier E, Kavallaris M, Andre N. Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(8):455–65.
30. Ma Y, et al. Recent Advancements in Pancreatic Cancer Immunotherapy. *Cancer Res Front*. 2016;2(2):252–76.
31. Tempero MA, et al. Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2014: featured updates to the NCCN guidelines. *J Natl Compr Canc Netw*. 2014;12(8):1083–93.
32. Andreatta M, Nielsen M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system. *Bioinformatics*. 2016;32(4):511–7.
33. Nielsen M, et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci*. 2003;12(5):1007–17.
34. Rammensee H, et al. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999;50(3–4):213–9.
35. Andreatta M, et al. Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification. *Immunogenetics*. 2015;67(11–12):641–50.
36. Schilbach K, et al. Cancer-targeted IL-12 controls human rhabdomyosarcoma by senescence induction and myogenic differentiation. *Oncoimmunology*. 2015;4(7):e1014760.
37. Van Coppennolle S, et al. Functionally mature CD4 and CD8 TCR $\alpha\beta$  cells are generated in OP9-DL1 cultures from human CD34+ hematopoietic cells. *J Immunol*. 2009;183(8):4859–70.
38. Hernandez-Pigeon H, et al. Human keratinocytes acquire cellular cytotoxicity under UV-B irradiation. Implication of granzyme B and perforin. *J Biol Chem*. 2006;281(19):13525–32.
39. Miles JJ, Douek DC, Price DA. Bias in the  $\alpha\beta$  T-cell repertoire: implications for disease pathogenesis and vaccination. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(3):375–87.
40. Zvyagin IV, et al. Tracking T-cell immune reconstitution after TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted hematopoietic cells transplantation in children. *Leukemia*. 2017;31(5):1145–53.
41. Grant EP, et al. Molecular recognition of lipid antigens by T cell receptors. *J Exp Med*. 1999;189(1):195–205.
42. Klenerman P, Oxenius A. T cell responses to cytomegalovirus. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(6):367–77.
43. Kumar R, et al. Increased sensitivity of antigen-experienced T cells through the enrichment of oligomeric T cell receptor complexes. *Immunity*. 2011;35(3):375–87.
44. Suzuki G, et al. Antigen-induced suppression of the proliferative response of T cell clones. *J Immunol*. 1988;140(5):1359–65.
45. Jenkins MK, et al. Inhibition of antigen-specific proliferation of type 1 murine T cell clones after stimulation with immobilized anti-CD3 monoclonal antibody. *J Immunol*. 1990;144(1):16–22.
46. Born WK, Aydintug MK, O'Brien RL. Diversity of  $\gamma\delta$  T-cell antigens. *Cell Mol Immunol*. 2013;10(1):13–20.
47. Born WK, et al. Peptide antigens for  $\gamma\delta$  T cells. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(14):2335–43.
48. Roark CE, et al. Response of a  $\gamma\delta$  T cell receptor invariant subset during bacterial infection. *J Immunol*. 1996;156(6):2214–20.
49. Takeuchi A, et al. CRTAM determines the CD4+ cytotoxic T lymphocyte lineage. *J Exp Med*. 2016;213(1):123–38.
50. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*. 2003;101(11):4260–6.
51. Gazzola A, et al. The evolution of clonality testing in the diagnosis and monitoring of hematological malignancies. *Ther Adv Hematol*. 2014;5(2):35–47.
52. Miyai M, et al. Detection and tracking of NY-ESO-1-specific CD8+ T cells by high-throughput T cell receptor beta (TCRB) gene rearrangements sequencing in a peptide-vaccinated patient. *PLoS ONE*. 2015;10(8):e0136086.
53. Yamada A, et al. Next-generation peptide vaccines for advanced cancer. *Cancer Sci*. 2013;104(1):15–21.
54. Saglio F, Hanley PJ, Bollard CM. The time is now: moving toward virus-specific T cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation as the standard of care. *Cytotherapy*. 2014;16(2):149–59.
55. Castano AR, et al. Peptide binding and presentation by mouse CD1. *Science*. 1995;269(5221):223–6.
56. Elliott JI. Selection of dual Va T cells. *Eur J Immunol*. 1998;28(7):2115–23.
57. Casanova JL, et al. T cell receptor genes in a series of class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a *Plasmodium berghei* nonapeptide: implications for T cell allelic exclusion and antigen-specific repertoire. *J Exp Med*. 1991;174(6):1371–83.
58. Padovan E, et al. Expression of two T cell receptor  $\alpha$  chains: dual receptor T cells. *Science*. 1993;262(5132):422–4.
59. Heath WR, et al. Expression of two T cell receptor  $\alpha$  chains on the surface of normal murine T cells. *Eur J Immunol*. 1995;25(6):1617–23.
60. Alam SM, Gascoigne NR. Posttranslational regulation of TCR Va allelic exclusion during T cell differentiation. *J Immunol*. 1998;160(8):3883–90.
61. Davodeau F, et al. Dual T cell receptor  $\beta$  chain expression on human T lymphocytes. *J Exp Med*. 1995;181(4):1391–8.
62. Padovan E, et al. Normal T lymphocytes can express two different T cell receptor  $\beta$  chains: implications for the mechanism of allelic exclusion. *J Exp Med*. 1995;181(4):1587–91.
63. Gavin MA, Rudensky AY. Dual TCR T cells: gaining entry into the periphery. *Nat Immunol*. 2002;3(2):109–10.
64. Thor Straten P, et al. T-cell clonotypes in cancer. *J Transl Med*. 2004;2(1):11.
65. Ge Q, et al. Development of CD4+ T cells expressing a nominally MHC class I-restricted T cell receptor by two different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(6):1822–7.
66. Badoual C, et al. PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Res*. 2013;73(1):128–38.
67. Pundir S, Martin MJ, O'Donovan C. UniProt protein knowledgebase. *Methods Mol Biol*. 2017;1558:41–55.

# Additional files

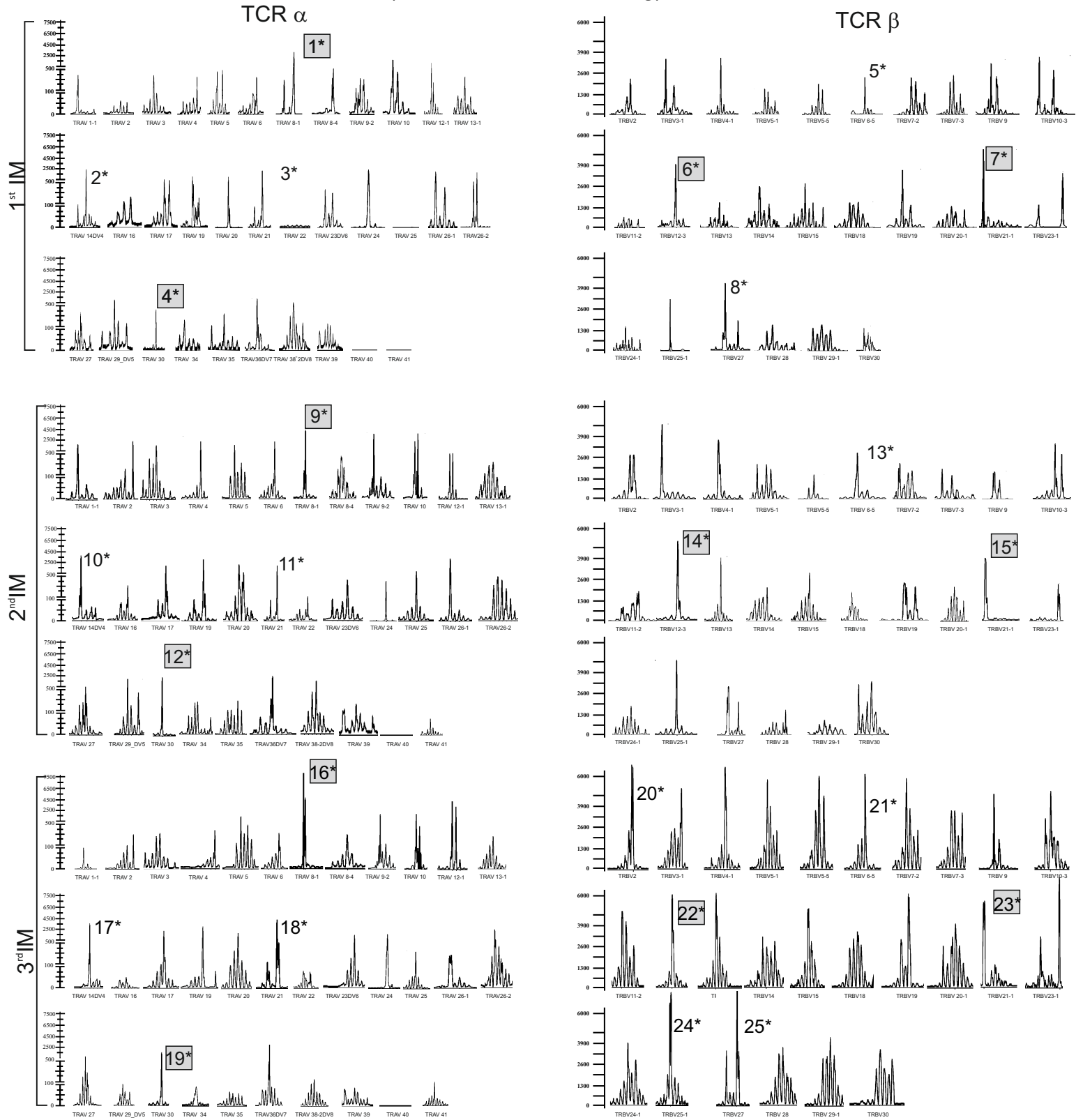


Additional file 1: Figure S1. Work flow of immune monitoring techniques.



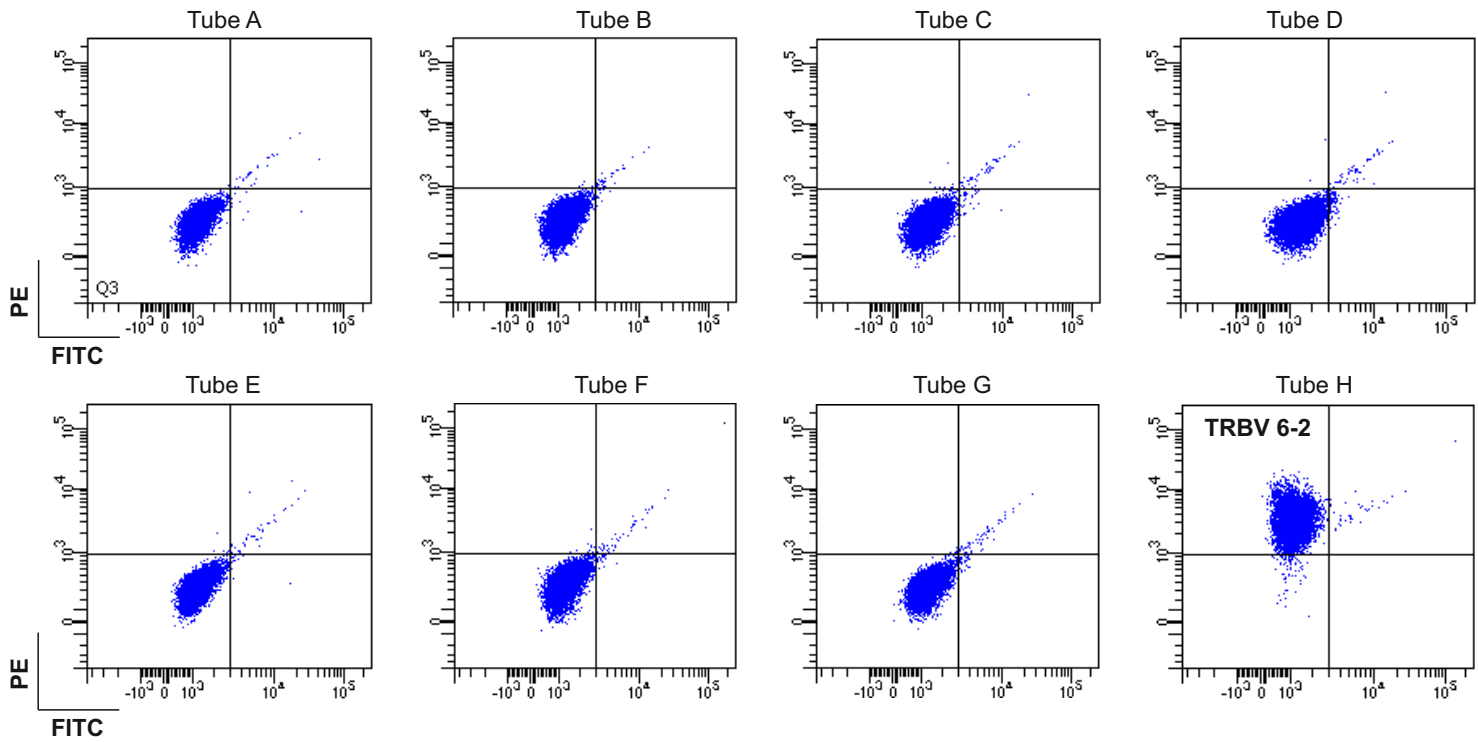
Additional file 2: Figure S2. Activation markers expressed by vaccine-reactive T cell clones at IM3. T cells responding to vaccine peptide stimulation with IFN- $\gamma$ + production were analyzed for their expression of the activation markers CD25, CD69 and HLA-DR by flow cytometry.

# TCR variable segments of locus (before immune monitoring)



Additional file 3: Figure S3. Spectratype analysis of patient PBMCs without prior short term culture. TCR repertoire analysis including 34 TCR $\alpha$  and 24 TCR $\beta$  families. Numbers indicate CDR3 sequencing data gained in direct sequencing approaches (see Table 3). Peak numbers marked in grey harbor CMV-specific sequences.

a



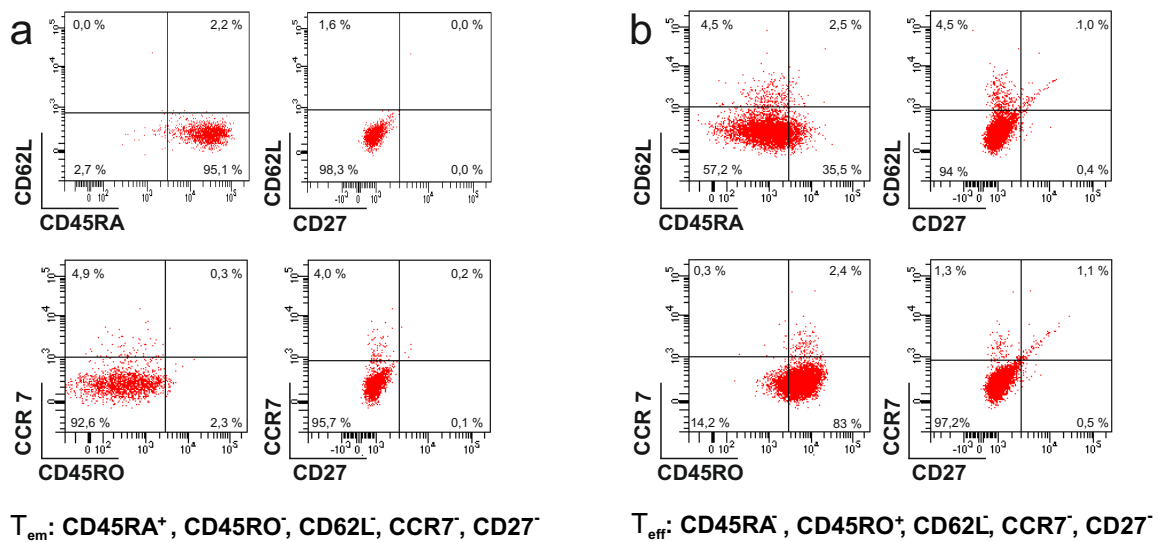
b

clone ID	V $\alpha$	J $\alpha$	CDR3seq		
			V $\alpha$	N	J $\alpha$
4,6,8,10	39	15	CAV	LL	NQAGTALIF

V $\beta$	D $\beta$	J $\beta$	CDR3seq		
			V $\beta$	N	J $\beta$
6-2	D2	2-7	CASS	GLAGRR	YEQYF

Additional file 4: Figure S4. Clonality analysis of 21 control cultures (without peptide stimulation) at IM3 was performed by flow cytometry. All control clones were found to express all the same TCRV $\beta$  chain (BV 6-2), confirming molecular data, indicating a common, high-frequency progenitor in peripheral blood. (a) shows representative flow cytometry data of clone #6. Individual TCRV $\beta$  antibody staining are achieved by combining 3 TCR V $\beta$ -specific reagents in a single test using only two colors for mab conjugation: one TCR V $\beta$  antibody is conjugated to FITC, another one to PE, and the third to both FITC and PE. In this way, the third V $\beta$ -stained population shows up in the diagonal of the upper right quadrant in a FL1/FL2 histogram. The CDR3 sequence of the analyzed clone (b) is identical to a TCR sequence specific for mycolic acid [41].



Additional file 5: Figure S5. Peptide-responsive clones at IM3 all displayed an CD45RA<sup>+</sup> effector memory TEMRA phenotype. One representative example (clone #54) is shown in (a). In contrast, clones obtained from control cultures without peptide stimulation expressed a CD45RA<sup>neg</sup> effector memory phenotype, data by clone #6 are shown in (b).



# Chronic graft-versus-host-disease in CD34<sup>+</sup>-humanized NSG mice is associated with human susceptibility HLA haplotypes for autoimmune disease



Katja Sonntag<sup>a,1</sup>, Franziska Eckert<sup>a,b,1</sup>, Christian Welker<sup>a</sup>, Hartmut Müller<sup>c</sup>, Friederike Müller<sup>a</sup>, Daniel Zips<sup>b</sup>, Bence Sipos<sup>c</sup>, Reinhild Klein<sup>d</sup>, Gregor Blank<sup>a</sup>, Tobias Feuchtinger<sup>e</sup>, Michael Schumm<sup>a</sup>, Rupert Handgretinger<sup>a</sup>, Karin Schilbach<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of General Pediatrics, Oncology/Hematology, Eberhard Karls University Tübingen, Hoppe-Seyler-Str. 1, 72076 Tübingen, Germany

<sup>b</sup> Department of Radiation Oncology, Eberhard Karls University Tübingen, Hoppe-Seyler-Str. 3, 72076 Tübingen, Germany

<sup>c</sup> Institute of Pathology, Eberhard Karls University Tübingen, Liebermeisterstraße 8, 72076 Tübingen, Germany

<sup>d</sup> Laboratory for Immunopathology, Eberhard Karls University Tübingen, Otfried-Müller-Straße 10, 72076 Tübingen, Germany

<sup>e</sup> Pediatric Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation Dr. von Hauner'sches Kinderspital, Ludwig-Maximilian-University Munich, Lindwurmstraße 4, 80337 München, Germany

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 2 March 2015

Received in revised form

27 May 2015

Accepted 7 June 2015

Available online 3 July 2015

### Keywords:

Chronic graft-versus-host disease

Autoimmunity

cGVHD model

cGVHD pathology

Extended HLA haplotypes

T-cell-receptor repertoire

Humanized mouse

## ABSTRACT

Chronic graft-versus-host disease (cGVHD) is a significant hurdle to long-term hematopoietic stem-cell transplantation success. Insights into the pathogenesis and mechanistical investigations of novel therapeutic strategies are limited as appropriate animal models are missing. The immunodeficient NSG mouse – when humanized with human bone marrow, fetal liver and thymus (BLT NSG) – is prone for cGVHD, yet mainly affects the skin. In contrast, the NSG mouse humanized exclusively with CD34<sup>+</sup>-selected, CD3<sup>+</sup>-depleted stem cells (CD34<sup>+</sup>NSG) has neither been described for acute nor chronic GVHD so far. This is the first report about the development of systemic autoimmune cGVHD  $\geq 24$  weeks post stem cell receipt involving lung, liver, skin, gingiva and intestine in two NSG cohorts humanized with CD34<sup>+</sup> grafts from different donors. Affected mice presented with sclerodermatous skin, fibrotic lung, severe hepatitis, and massive dental malformation/loss. CD4<sup>+</sup>-dominated, T<sub>H</sub>2-biased, bulky T-cell infiltrates featured highly skewed T cell receptor (TCR) repertoires, clonal expansions, and autoreactive TCRs. In affected tissues profibrotic IL-13 and -4 dominated over T<sub>H</sub>1 cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Thus, the time point of manifestation and the phenotype match human systemic pleiotropic sclerodermatous GVHD. The CD34<sup>+</sup>NSG-model's intrinsic deficiency of thymus, thymus-derived regulatory T cells (nTreg) and B cells emphasizes the role of the genetic polymorphism and the cytokines in the pathogenesis of cGVHD. Importantly, the only factor discriminating diseased versus non-diseased CD34<sup>+</sup>NSG cohorts were two risk HLA haplotypes that in human mediate susceptibility for autoimmune disease (psoriasis). Thus, the CD34<sup>+</sup>NSG model may serve as a platform for addressing issues related to the pathophysiology and treatment of human autoimmunity and chronic GVHD.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Chronic graft-versus-host disease (cGVHD) is a significant hurdle to long-term hematopoietic stem cell transplantation success.

Effective treatments for cGVHD have been difficult to develop, since exact causes for the disease are enigmatic. This is in part due to the inability of animal models to recapitulate the multiorgan pathologies observed in clinical cGVHD [1].

Acute GVHD (aGVHD) results from an immune-mediated attack on recipient tissue by donor T cells contained in or developed from the graft [2,3] that recognize and bind their cognate ligands on recipient antigen-presenting cells (APC) in combination with essential second signals on the APC's surface. The resulting

\* Corresponding author. University Children's Hospital, Clinical and Experimental Immunology, Hoppe-Seyler-Str. 1, 72076 Tübingen, Germany.

E-mail address: [karin.schilbach@med.uni-tuebingen.de](mailto:karin.schilbach@med.uni-tuebingen.de) (K. Schilbach).

<sup>1</sup> Contributed equally to the work.



cytolytic T-cell response is executed via perforin, granzymes and Fas ligand as well as inflammatory cytokines augmenting this response. The pathophysiology of cGVHD is less well understood. cGVHD is typically an autoimmune-like syndrome developing gradually, involving donor (-derived) T cells primed on APCs. cGVHD autoimmune-like syndrome is thought to involve three main pathological mechanisms: autoantibody production, systemic fibrosis and defects in thymic function. Existing murine cGVHD models simulate one or more of these pathologic manifestations, such as increased serum anti-DNA antibodies, scleroderma, and fibrosis of skin and liver, as well as rare immune complex deposition in kidneys and glomerulonephritis [1,4,5]. However, the type of multiorgan involvement and alloantibodies seen in cGVHD patients often has not been well represented in these preclinical models.

A relatively new system to investigate disease pathophysiology relating to human thymic events and to evaluate treatment strategies that combat multiorgan fibrotic pathology produced by human immune cells is the BLT NSG mouse, in which human hematopoietic stem cells, fetal liver, and fetal thymus are co-transplanted. In this model, delayed or reduced hematopoietic stem cells engraftment does not affect the timing or progression of cGVHD manifestations, but the severity of disease highly correlates inversely with the frequency of FoxP3<sup>+</sup> thymocytes and specific HLA class I alleles of the donor tissue.

Here we report the first cases of autoimmune systemic sclerodermatous GVHD in NSG cohorts that were humanized using exclusively CD34<sup>+</sup>-selected, CD3<sup>+</sup>-depleted stem cell grafts (huCD34<sup>+</sup>NSG). Two grafts out of 15 induced cGVHD and were derived from two different donors. Each cGVHD cohort was humanized with a single donor graft. We characterize the cGVHD pathology on histologic, transcriptional, and molecular level.

We show that the HLA haplotypes of the two pathogenic CD34<sup>+</sup> grafts differing in every single MHC class I and II allele share a strong risk association with psoriasis type I. We conclude that the huCD34<sup>+</sup>NSG model may serve as a platform to study the role of human susceptibility and risk factors in the break of tolerance and autoimmunity.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

NSG mice (JAX mouse stock name NOD.Cg-Prkdcscid112rgtm1Wjl/SzJ; Jackson Laboratory) were housed in single airflow cages under specific pathogen-free conditions. All animal experiments were performed according to the standards of both the ethic committee board and animal care committee of the University of Tübingen (Nr. K01/07 and K06/11).

### 2.2. Humanization of mice

10 to 12 week-old NSG mice received total body irradiation with 250 cGy prior to stem cell transplantation. Stem cells were obtained from a surplus of donors for patients of our institution who consented to the scientific use of surplus cells according to the declaration of Helsinki. After T-cell depletion, CD34<sup>+</sup> stem cells were frozen and stored in liquid nitrogen until use. For humanization, CD34<sup>+</sup> cells were thawed and  $1 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> stem cells in 100  $\mu$ l prewarmed PBS were injected intravenously. Engraftment was supported by the weekly application of 20  $\mu$ g FcIL-7 i.v. (Merck, Germany), a fusion protein providing IL-7 for fostering of T-cell development in a stable form with bioavailability over 7 days after injection [6].

### 2.3. Six-color flow cytometry

Immune reconstitution in this model was evaluated 10–12 weeks after transplantation as described previously [6].

Blood samples were taken from individuals that developed sclerodermatous skin and lymphocytes and stained with anti-human CD45, anti-human CD3, and anti-human CD19. Engraftment and T cell numbers of cGVHD mice were compared with non-diseased littermates that had received the same graft. Lymphocyte samples were stained with AlexaFluor 350<sup>®</sup> amine-reactive dye for life dead exclusion. Flow cytometry was performed on an LSR II using Diva<sup>®</sup> software (BD Biosciences).

### 2.4. Histology and immunohistochemistry

Sclerodermatous GVHD-affected mice were sacrificed at different stages of disease and organs were explanted. Fixed, paraffin-embedded tissue was then stained with haematoxylin-eosin. For immunohistochemistry sections were blocked with serum before primary antibodies CD3(SP7), CD4(SP35), CD8(SP16) (DCS, Hamburg, Germany), were applied and detected with Zytocem Plus AP-Kit (Zytomed systems, Berlin, Germany). Control stainings excluded primary antibodies. Samples were analyzed for tissue integrity and leukocytic infiltrates by a blinded pathologist. Evaluation was semiquantitative, + indicating mild infiltration, ++ and +++ increasing numbers of infiltrating cells.

### 2.5. T-cell receptor (TCR) repertoires

Organs were explanted and shock frozen in liquid nitrogen. RNA was isolated using RNeasy mini kit, the RNase-Free DNase Set (both Qiagen, Germany). cDNA was synthesized with Superscript III First Strand Synthesis Super Mix (Life Technology, Germany). TCR V $\alpha$  spectratyping, TCR V $\beta$  spectratyping and  $\gamma\delta$  immunoscope were performed as previously described [6]. PCR products of samples showing single peaks of V $\alpha$  were directly sequenced using BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technology, Germany) and corresponding amino acid sequences identified with EMBOSS Transeq free software.

### 2.6. Expression of cytokines

mRNA transcript levels for GATA3, TGF- $\beta$ , IL-13, CCL2, IL-4, IL-10, T-bet, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CD40L, IL-17 and FoxP3 were determined in fresh frozen tissue of skin, lung, and liver with real-time PCR on a BioRad C1000 Thermal cycler/CFX96 real-time System (BioRad, Germany), using cDNA specific primers (all sequences available on request) and the RT<sup>2</sup> SYBR Green Fluor FAST Mastermix (Qiagen, Germany). Expression was normalized to human GAPDH expression.

### 2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with two-tailed student's *t*-test if not indicated otherwise. Survival of animals was calculated with Kaplan-Meier-method, curves were compared with log-rank tests. Differences were considered significant at a *p*-value <0.05.

## 3. Results

### 3.1. Phenotype of GVHD mice

24 weeks after transplantation 30 of 71 CD34<sup>+</sup>NSG mice (42%) in cohort I developed sclerodermatous skin. Cohort II developed cGVHD pathology 28 weeks post-transplantation of a CD34<sup>+</sup> graft

from a different donor in three of 35 mice. In both cohorts changes began at the snout, resulting in whole body alopecia and scaly skin over time (Fig. 1A–C). Preceding, most animals presented with dental abnormalities including long growing and/or splintering, fragile teeth, and/or loss of front teeth (Fig. 1C), necessitating the nourishment of animals with soft food. While the skin pathology was progressive over time, no significant weight loss was observed. The general state of the animals did not deteriorate for long periods of time, until the late stage of disease, when animals showed amyostasia and hyperagitation.

3.2. Human cell populations in peripheral blood of affected animals

Human CD45<sup>+</sup> engraftment was tested in eight mice suffering from cGVHD week 24 post graft receipt in cohort I. Engraftment varied between 7.6% and 68.9% (mean: 39.9% ± 7.4%) with the proportion of T cells ranging from 95.9% to 99.5% (mean

98.1% ± 2.3%) of CD45<sup>+</sup> cells. Hardly any B cells were detected (mean 0.06% ± 0.05%) (Fig. 2A,B). Accordingly no serological evidence for relevant autoantibodies was found (Table 1).

The engraftment rate was significantly higher in cGVHD affected animals compared to non-diseased mice of the same graft cohort (39.9% vs. 9.6%) (p = 0.005) as was the percentage of T cells (98.1% vs. 90.1%, p = 0.0002, Fig. 2A,B).

3.3. Histology and immunohistochemistry

Histological analysis of skin, liver, lung, colon, kidney and small intestine of affected animals within cohort 1 and cohort 2 were compared with unaffected age-matched littermates, humanized with the same grafts and non-humanized NSG mice for controls.

The skin showed alopecia with hyperkeratosis and hypertrophy of the epidermis, scarring of the dermis and reduction or loss of epidermal appendices (Fig. 3A). There was increased dermal

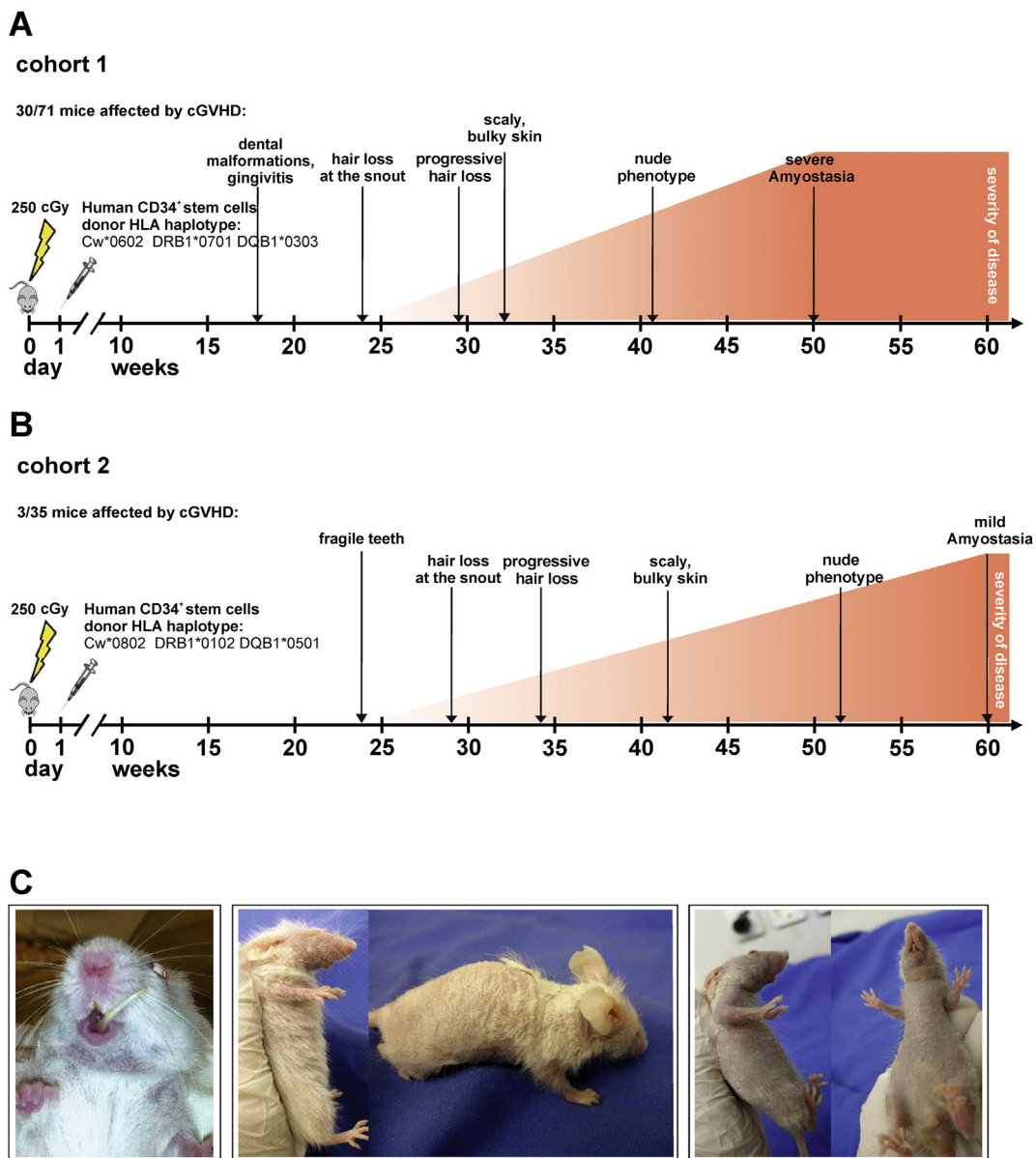
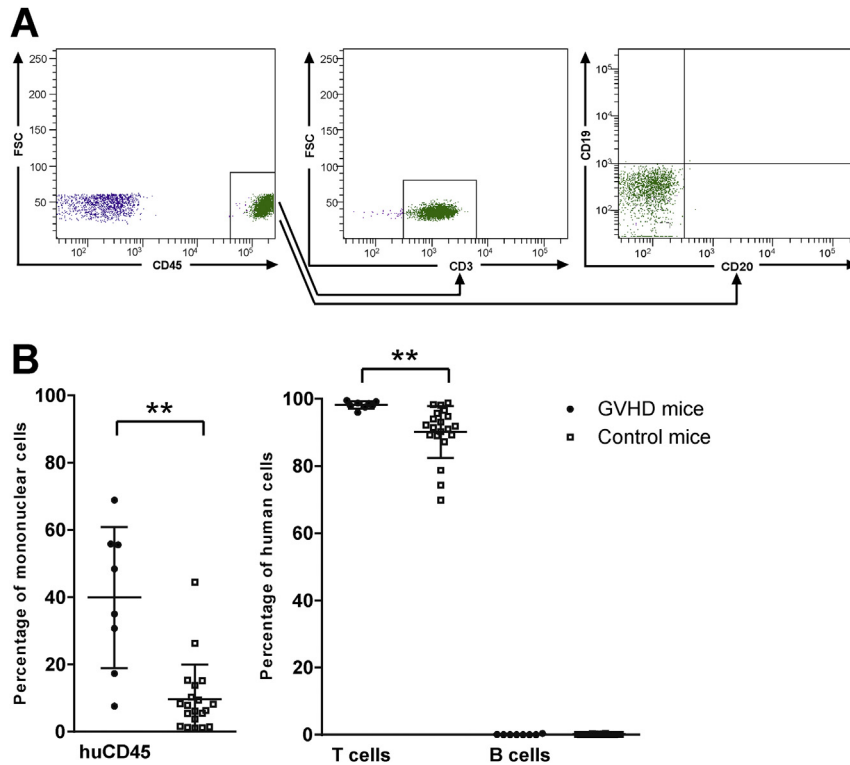


Fig. 1. Onset and development of chronic GVHD phenotype. Time bars indicate onset of disease and type of symptoms that appeared after humanization of the mice: (A) cohort 1 and (B) cohort 2. (C) cGVHD-diseased individuals of both cohorts presented with dental malformation/loss and gingivitis loss of fur, scaly skin and alopecia, acquired a nude phenotype and presented with amyostasia.



**Fig. 2.** T and B lymphocytes in engrafted human peripheral hematopoietic cells in blood of healthy and cGVHD-affected animals (A) T cells (CD3) constitute almost 100% of peripheral human blood cells whereas B cells (CD20) were not detected. One FACS plot representative for all members and representative for both cohorts is exemplarily shown. (B) Animals suffering from cGVHD show significantly higher engraftment and thus significantly higher percentages of T cells than their healthy litter mates. Animals were analyzed at the same time point after graft receipt.

**Table 1**

Serological screening data for the detection of relevant autoantibodies. 32 weeks after humanization blood from 10 mice was collected submandibularly and was pooled for autoantibody screening and serologic diagnosis of autoimmune diseases. No autoimmune specific antibodies were observed.

Autoantibodies-screening			
<b>Immunofluorescence test (IFL):</b>			
<b>A) on frozen sections: antibodies against:</b>			
Nuclei (ANA)	Nonexistent		
Nucleoli	Nonexistent		
Smooth muscles (SMA)	Nonexistent		
Actin	Nonexistent		
Mitochondria (AMA)	Nonexistent		
Liver-kidney microsomes (LKM)	Nonexistent		
Vascular endothelium (AEA)	Nonexistent		
Sarcolemma heart/stomach (ASA)	Nonexistent		
Sinusoids (liver)	Nonexistent		
Thyroid	Nonexistent		
Parietal cell	Nonexistent		
Fibrils	Nonexistent		
Heart muscle fibers	Nonexistent		
<b>B) on cell cultures: (titer) IgG</b>			
ANA	Nonexistent		
Nucleoli	Nonexistent		
Nuclear membrane	Nonexistent		
Mitochondria	Nonexistent		
Nuclear dots	Nonexistent		
Centromeres (ACA)	Nonexistent		
Endoplasm. reticulum	Nonexistent		
Cytokeratin	Nonexistent		
Cytoplasm	Nonexistent		
Fine dots	Nonexistent		
Other antibodies	Nonexistent		
<b>C) on granulocytes:</b>			
cANCA	Nonexistent		
pANCA	Nonexistent		
ANA	Nonexistent		
<b>Serological diagnosis of autoimmune diseases</b>			
Inflammatory rheumatic diseases (collagenosis, vaskuliden, RA) antibodies against:			
ds DNA (ELISA IU/ml)	Nonexistent		
ZNS antigene (ELISA IgG/IgM)	Nonexistent		

infiltration of CD3<sup>+</sup> T lymphocytes (median: +++) slightly dominated by CD4<sup>+</sup> cells (median CD4: +++++ vs median CD8: ++, Fig. 4A). The number of CD117<sup>+</sup> mast cells again was slightly increased (median: +, not shown).

**The lungs** showed perivascular and peribronchial mild fibrosis Fig. 3A and especially peribronchial dense infiltrates of CD3<sup>+</sup>

lymphatic cells (median: +++) dominated by CD4<sup>+</sup> lymphocytes (CD4 median: +++++ vs CD8 median: +++, Fig. 4B) in cGVHD-affected mice. Also, the number of mast cells was slightly increased (median: +) (not shown).

**The liver** developed several degrees of morphological changes ranging from almost normal to fulminant presentation of hepatitis

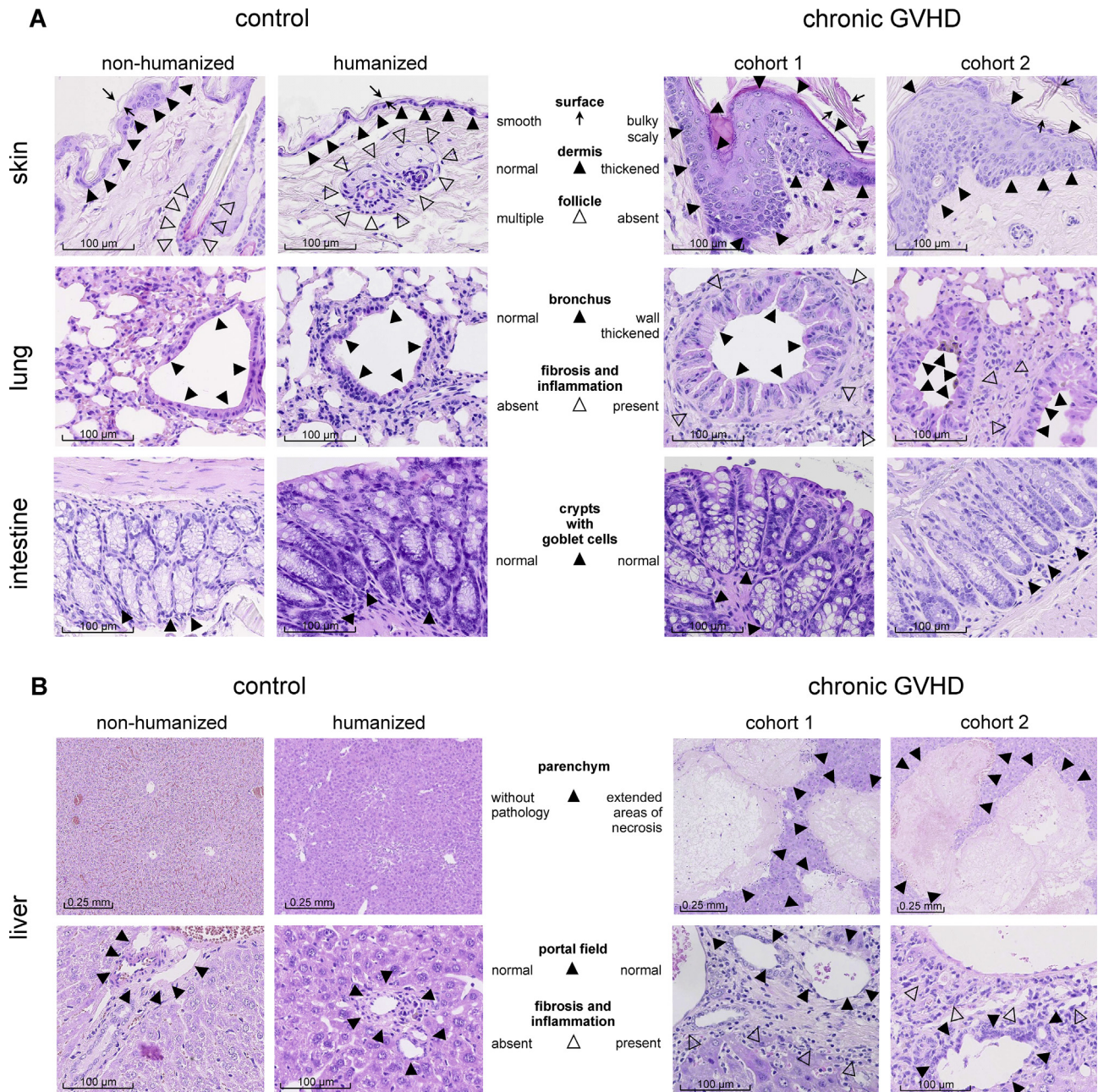
with large confluent necrosis (Fig. 3B), focally strong portal inflammation with interface hepatitis and moderate numbers of granulomas with epithelioid macrophages and giant cell formation. Intermediate changes included moderate portal fibrosis with and without inflammation, granulomas and granulomatous hepatitis principally reminding of sarkoidosis. Compared with controls, all livers with and without morphological changes showed increased infiltrates of CD3<sup>+</sup> lymphatic cells slightly dominated by CD4<sup>+</sup> lymphocytes (median CD4: +++ vs median CD8: ++, Fig. 4C). The number of mast cells was also slightly elevated (median: +) (not shown).

In the small and large intestine no significant changes appeared (Figs. 3A and 4D).

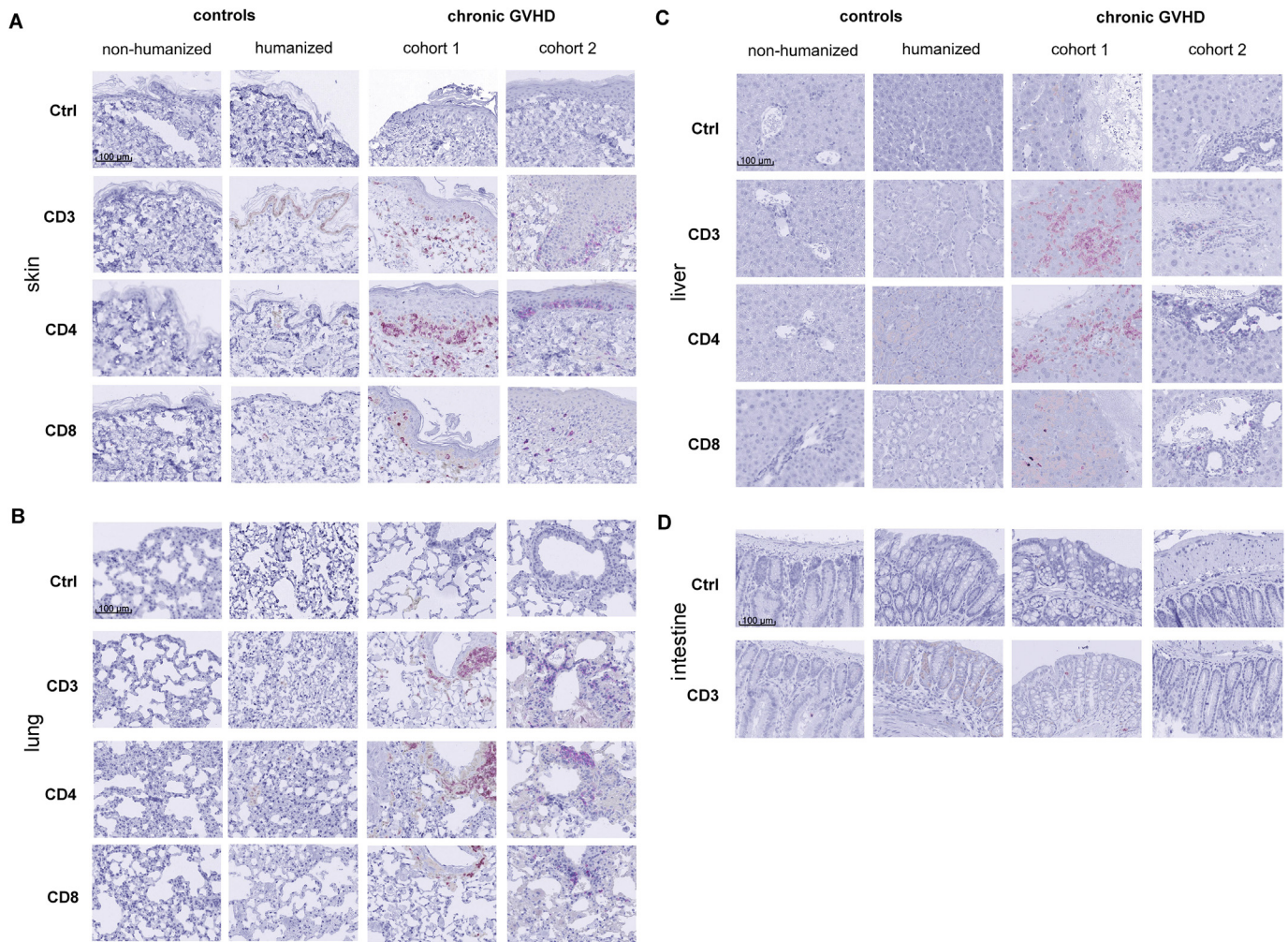
### 3.4. Epitope specific T-cell response

As increased CD3<sup>+</sup> infiltrates were observed in organs of individuals suffering from cGVHD, we looked for evidence of antigen-driven T-cell activation, testing for selected expansion of subsets of T cells.

T cell receptor (TCR)  $\alpha$  repertoires in bone marrow, skin, spleen, and lung were of restricted diversity indicated by a highly skewed Gaussian pattern with single peaks indicating the preferential expansion of distinct T-cell clones. Direct sequencing approaches identified 29 V $\alpha$  sequences in 4 different individuals. Identical sequences ("i") were present in different organs of the same (seqs. 4/7, 20/25, 22/26) and also of other individuals (seqs.10/15, 11/16).



**Fig. 3.** Histologic analysis of (A) skin, lung, and intestine and (B) liver from cGVHD-affected mice of cohort 1 and cohort 2 and healthy controls (humanized mouse and non-humanized mouse).



**Fig. 4.** Immunohistochemistry of cGVHD-affected tissues and healthy controls. Representative stainings for CD3, CD4, CD8 are shown for each cohort for skin (A), lung (B), liver (C) and intestine (D). Skin, liver and lung of cGVHD-affected but not control individuals show dense immune infiltrates, dominated by CD4<sup>+</sup> T cells. The intestine is not targeted by T cells.

Convergent CDR3 formation – identical CDR3 regions but involving rearrangement of different variable and different J segments – occurred intra- (seqs 5/10, 12/15, 21/28, 18/19) as well as inter-individually (seqs. 5/12, 5/15, 10/12) (indicated as “c” for convergent) (Table 2). Moreover, we found homologous CDR3 motifs (seqs 2, 17, 18, 24) (Table 2). These results indicate an epitope-specific T-cell response against one or very few epitope(s). Also, germline-encoded TCRs that show enhanced susceptibility to autoimmunity [7–9] were found (seqs 11 and 16) (Table 2). CDR3 regions of V $\alpha$ -chains were short (1–3 amino acids) with a predominance of hydrophobic residues, a feature also described for autoimmune TCRs [10–12] (Table 2).

CDR3 regions of the V $\beta$ -chains frequently showed 2 motifs: GG (6/14 sequences) or RX, i.e. positively charged arginine (R) followed by a hydrophobic amino acid with either a phenol- or indolring or both (5/14 sequences) (Table 3). CDR3 regions not harboring either of the motifs showed up to four amino acids with hydrophobic side chains (seq. 5, 9, 11), a feature of autoimmune TCRs (see above) (Table 3). Importantly, the V $\beta$  CDR3 motif GLAG (seq. 11) was previously identified in skin lesions of a patient with acute GVHD [10]. Moreover, GLAG (seq. 11) is corresponding to CDR3 motif LXG, that was found in multiple TCRs of skin-specific T cells in different patients with SLE (systemic lupus erythematosus) [13] (Table 3).

We also found oligoclonal expansions of V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T cells (Fig. 5A) as

described for systemic sclerosis (scleroderma) [14]. Intriguingly, a WGI motif was present in the TCR CDR3 region of clonally predominant V $\delta$ 1 T cells in all individuals examined (Fig. 5B). This WGI motif involves the rearrangement of the TCR $\delta$ D3 segment and the addition of non-germline-encoded N nucleotides, suggesting that a common antigenic pressure may shape the V $\delta$ 1 repertoire in these mice. Interestingly, one of the V $\delta$  CDR3 sequences (#2, Fig. 5B) was identical in a CDR3 stretch of 6 amino acids (18 nucleotides) with a V $\delta$  CDR3 sequence identified in a patient 19 months after haploidentical stem cell transplantation [15]. Thus, multiple characteristics of the human  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  TCR repertoire indicate an autoimmune antigen-specific T-cell-driven phenotype of cGVHD in this model.

### 3.5. Cytokine expression

cGVHD-affected tissue showed high levels of mRNA coding for the transcription factor GATA3 and for profibrotic TGF- $\beta$  and IL-13 indicating T<sub>H</sub>2-biased CD4 compartments. The T<sub>H</sub>1-associated marker genes T-bet and IFN- $\gamma$  were less transcribed, but TNF- $\alpha$  was strongly expressed in the lung, yet not the skin or liver. The hallmark molecule for regulatory T-cells FoxP3 was not found, which is in line with the lack of FoxP3<sup>+</sup> nTreg lineage in the CD34<sup>+</sup>NSG mice. The expression pattern of CD40L indicated T-cell activation in the liver (Fig. 6).

**Table 2**

T-cell-receptor  $\alpha$ -chain CDR3 sequences of clonally expanded T cells in cGVHD-affected organs. TCR $\alpha$  cDNA was subject to polymerase chain reaction amplification and the products sequenced as given in Materials and Methods. The CDR3 region constitutes the region of the TCR that directly binds the recognized epitope. Clonally expanded TCRs  $\alpha$ -chains composition of the variable segment ( $V\alpha$ ) and the joining segment ( $J\alpha$ ) are given and their CDR3 sequence (given in **bold**), a region that results from non-germline encoded addition of N Nucleotides in the process of somatic recombination. Identical CDR3 sequences (“i”) were present in TCRs found in different organs of the same and also different individuals. Convergent CDR3 formation (“c”) resulting from the combination of different variable regions and addition of different N nucleotides that together are coding for the same amino acids due to the degeneration of the genetic code were identified in different organs of the same as well as different individuals. CDR3 sequences harboring homologous motifs (“h”) were present in different TCRs of different organs of the same as well as other individuals. “segm.” indicates: segment; “seq” indicates: sequence.

mouse organ	Seq.ID	$V\alpha_{family}$	$J\alpha_{segm.}$	$V\alpha_{seq}$	CDR3 <sub>seq</sub>	$J\alpha_{seq}$		
90	skin	1	38-2DV8	31	CAYRS	<b>VS</b>	NARLMF	GDG
		2	6	20	CAL	<b>EG</b>	NDYKLSF	GAG
		3	9-12	20	CA	<b>PYF</b>	NDYKLSF	GAG
		4	20	23	CAV	<b>IQRM</b>	IYNQGGKLI	GQG
	spleen	5	22	26	CAV	<b>P</b>	NYGQNFVF	GPG
		6	3	11	CAVR	<b>RAY</b>	SGYSTLTF	GAG
		7	20	23	CAV	<b>IQRM</b>	IYNQGGKLI	GQG
	bm	8	1-2	40	CAV	<b>IP</b>	TSGTYYIF	GTG
		9	19	38	CAL	<b>TLD</b>	AGNNRKLIV	GLG
		10	26-1	27	CIV	<b>P</b>	NTNAGKSTF	GDG
		11	1-2	34	CAV	<b>P</b>	YNTDKLIF	GTG
92	lung	12	25	9	CAG	<b>P</b>	TGGFKTIF	GAG
		13	22	56	CAV	<b>LEAI</b>	GANSKLTF	GKG
		14	16	45	C	<b>KSFF</b>	GADGLTF	GKG
	spleen	15	26-1	27	CIV	<b>P</b>	NTNAGKSTF	GDG
		16	1-2	34	CAV	<b>P</b>	YNTDKLIF	GTG
194	skin	17	1-2	39	CAVR	<b>DRGSG</b>	NAGNMLTF	GGG
		18	22	53	CAVE	<b>E</b>	GSNYKLTFF	GKG
		19	38-2DV8	34	CAYRS	<b>E</b>	NTDKLIF	GTG
		20	10	4	CVV	<b>I</b>	FSGGYNKLIF	GAG
		21	34	30	CGAD	<b>AG</b>	DDKIIIF	GKG
		22	26-1	42	CIVR	<b>PFEFGH</b>	GGSQGNLIF	GKG
		23	26-2	47	CILRD	<b>PVDN</b>	YGNKLVF	GAG
	lung	24	8-4	42	CAVS	<b>D</b>	YGGSSQGNLIF	GKG
		25	10	4	CVV	<b>I</b>	FSGGYNKLIF	GAG
		26	26-1	42	CIVR	<b>PFEFGH</b>	GGSQGNLIF	GKG
		27	27	50	CAG	<b>DSRG</b>	KTSYDKVIF	GPG
		28	23DV6	24	CAAS	<b>AG</b>	DSWGKFEF	GAG
192	bm	29	25	47	CA	<b>TSL</b>	YGNKLVF	GAG

**Table 3**

T-cell-receptor  $\beta$ -chain CDR3 sequences of clonally expanded T cells in cGVHD-affected organs. TCR $\beta$  CDR3 segments (given in **bold**) were identified in direct sequencing approaches from highly skewed TCR families indicating clonal expansions of T cells. cDNA was amplified with TCR $\beta$  PCR specific primers and the products sequenced as described in Materials and Methods. Identified  $V\beta$ -chain CDR3 regions frequently displayed the motifs GG and RX, and GLAG (Seq.ID 11) which is reported in autoimmune disease in human. CDR3 sequences with identical (GG) or homologous motifs (RP, RF, RY) were present in multiple TCRs within different organs of the same as well as different individuals.

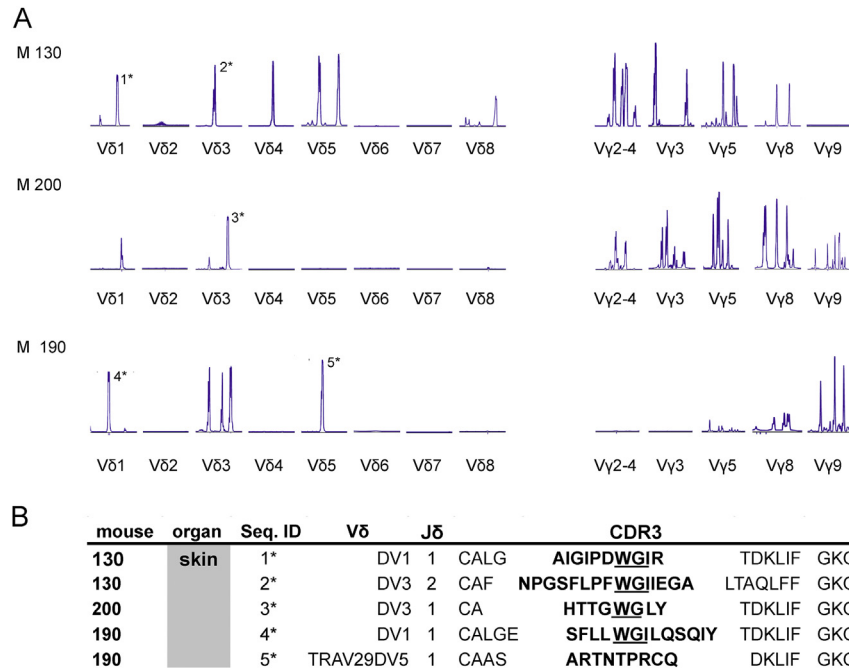
mouse organ	Seq.ID	$V\beta_{family}$	$D\beta_{segm.}$	$J\beta_{segm.}$	$C\beta_{segm.}$	$V\beta_{seq}$	CDR3 <sub>seq</sub>	$J\beta_{seq}$		
80	spleen	1	30	2-1	2-2	1	CAWS	<b>GRASGGRS</b>	GELFF	GEG
	spleen	2	30	1-1	1-4	1	CAWR	<b>DALGGG</b>	EKLFF	GSG
92	bm	3	5-6	1-1	2-1	2	CASSL	<b>DRY</b>	EQFF	GPG
		4	5-1	1-1	1-5	1	CASSL	<b>GG</b>	QPQHF	GDG
		5	27	1-1	2-5	2	CASSL	<b>FWDMV</b>	QETQYF	GPG
	spleen	6	11-2	2-2	1-1	1	CASS	<b>SRPGA</b>	EAFF	GQG
		7	30	1-1	2-2	2	CAWS	<b>VPTGGH</b>	NTGELFF	GEG
194	skin	8	9	1-1	2-3	1	CASS	<b>DGGAS</b>	DTQYF	GPG
		9	12-3	1-1	1-4	1	CASSL	<b>DRTAS</b>	TNEKLFF	GSG
	lung	10	15	1-1	1-4	1	CATSR	<b>GGAGSSK</b>	EKLFF	GSG
		11	10-3	2-1	2-3	1	CAIRS	<b>GLAGT</b>	STDTQYF	GPG
		12	13	2-2	2-2	2	CASS	<b>GRY</b>	TGELFF	GEG
		13	19	2-2	1-5	1	CASS	<b>ISPGRPLG</b>	NQPQHF	GDG
192	bm	14	5-6	2-1	1-1	1	CASS	<b>PRFSL</b>	NTEAFF	GQG

3.6. Comparison of HLA classes of different grafts and association with autoimmunity

Powerful modifiers of the incidence and manifestation of GVHD are HLA class I alleles [16,17]. MHC class II alleles have been identified as the main genetic risk factors for break of tolerance and autoimmune disorders [18]. A significant increase in the risk for

GVHD has also been demonstrated for several human HLA class I alleles in BLT mice (A1101, A2402, A3303, A201, B1302, B3502, Cw0602, Cw0401), whereas some (A3201, B801, B1401) showed a significant protective effect [19]. Thus, MHC class I and II alleles of 15 HLA-typed CD34<sup>+</sup> grafts that we had used for humanizing NSG cohorts were examined.

Several grafts that did not induce autoimmunity carried either



**Fig. 5.** Pauciclonal expansions of  $\gamma\delta$  T cells in cGVHD affected skin. (A) Immunoscope analysis of cGVHD affected skin in three individuals. (B) CDR3 region of TCR $\delta$ -chains acquired by direct sequencing approaches of single peaks, peaks are specified by numbers, see (A).

one or two MHC class I and/or class II alleles that are associated with susceptibility for autoimmune diseases (HLA ligands are listed in Table 5) like HLA class I allele Cw\*0602, reported for increased susceptibility for psoriasis and psoriatic arthritis (Table 4). In contrast extended haplotype Cw\*0602-DRB1\*0701-DQB1\*0303 reported as haplotype associated with psoriasis and severe alopecia areata [37,48,49] was expressed solely by the graft of cohort I (D1, Table 5). The extended haplotype Cw\*0802-DRB1\*0102-DQB1\*0501 (D2, Table 5) that is associated type I psoriasis and rheumatoid arthritis was exclusively expressed by the graft used to humanize cohort II [38,47]. Thus, the cGVHD-mediating grafts showed no conformity in any HLA class I and II alleles, but their haplotypes are both known as human autoimmunity susceptibility extended HLA-haplotypes for psoriasis.

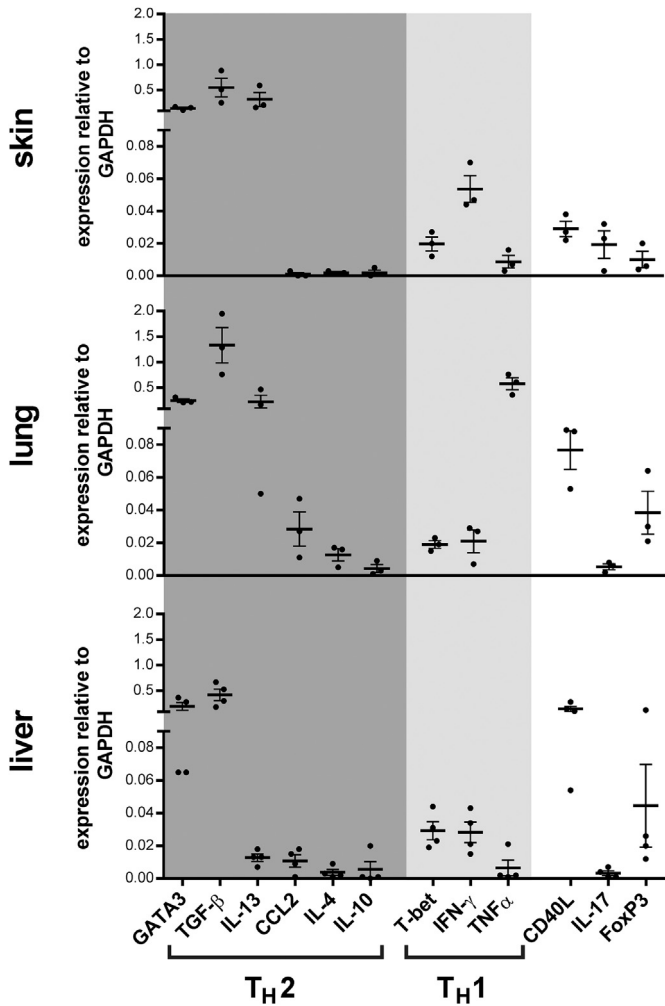
#### 4. Discussion

Model systems representing human cGVHD are of interest in the context of urgent needs to establish alternative therapeutic strategies for the disease, as chronic GVHD remains a major cause of morbidity and mortality in long-term survivors of allogeneic stem cell transplantation [50,51].

Advances have been made, yet precise criteria for diagnosis and classification of manifestations [52] as well as comprehensive knowledge about pathophysiology of cGVHD are still missing. The methods to prevent cGVHD remained largely the same over the last two decades, with suboptimal response to front-line treatment with corticosteroids and dismal prospect for second-line treatment in steroid-refractory disease. Clinical studies evaluating new agents for prevention and treatment of cGVHD are hampered by the inconsistencies in the design and only small numbers of multicenter studies [53]. Here, we provide phenotypic, functional and molecular evidence for the development of cGVHD in two NSG cohorts, each humanized with exclusively CD34<sup>+</sup>-selected, CD3<sup>+</sup>-depleted human hematopoietic stem cells (CD34<sup>+</sup>NSG), derived from a different stem cell donor. Histopathological changes and immunohistochemical results of cGVHD in CD34<sup>+</sup>NSG mice resemble

autoimmune phenomena and cGVHD in humans. Multiorgan lymphocytic infiltrates of skin, liver, kidney, and lung but not small and large intestine were dominated by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, resembling infiltrates of human cGVHD and autoimmune diseases [54,55]. Fibrosis developed mainly in the liver and the lung, with most of the histological changes and the granulomatous lesions in the liver composed of human epithelioid macrophages and giant cells. No evidence for the vanishing of the bile duct, resulting in ductopenia, was observed. Hepatitis however presented similarly to fulminant autoimmune hepatitis in human. Mice presented with alopecia and showed a scleroderma-like pathology characterized by scarring of the dermis and inflammatory infiltrates as seen in the late phase of cGVHD in human. Thus, the occurrence of cGVHD in CD34<sup>+</sup>NSG mice, late after stem cell transplantation and in the absence of prior clinical aGVHD, resembles human cGVHD in five major issues: 1) the incidence in recipients of T cell-depleted transplants [56], 2) the protracted begin of disease (six months post-transplantation), 3) the reproduction of a complex clinical spectrum of pleiotropism that in human can involve intestine, lungs, liver, salivary glands, eyes, oral mucosa, muscles, tendons and nerves, 4) the dominance of CD4<sup>+</sup> T cells in skin lesions [54,55] with an infiltration rate that is 100x fold compared to CD8, 5) the strong expression of the main pro-fibrotic mediators IL-13 and IL-4, which are gently balanced by anti-fibrotic T<sub>H</sub>1 cytokines IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in the tissues.

cGVHD in CD34<sup>+</sup>NSG thus differs to sclerodermatous cGVHD in the BLT model that mainly involves the skin significantly due to highly different pathophysiology. While the BLT NSG model – recipient of human bone marrow, liver, and thymic tissue – was developed based on the assumption that in absence of an autologous thymus, T-cell development and functionality is severely impaired [57], it has notably been shown that in mice lacking human thymic implants human T-cell progenitors can home to the murine thymus to generate polyclonal  $\alpha\beta$  TCR repertoires [58–60]. In line with this finding we and others showed that a broad T-cell repertoire can be generated in the CD34<sup>+</sup>NSG mouse in the absence of a human thymus [6]. Functionality of these T cells arisen from a



**Fig. 6.** Transcription factors, cytokines and immune markers in skin, lung and liver analyzed in cGVHD-affected individuals. Highly expressed GATA3 and TGF- $\beta$  indicate a T<sub>H</sub>2 polarized immune response; profibrotic TGF- $\beta$  and IL-13 are moderately balanced by TH1 cytokines in skin and lung.

chimeric “thymic organoid” consisting of mouse fibroblasts colonized by human myeloid and progenitor cells is to some extent obscure as human T-cell progenitors can be educated on human APCs but may also be reactive against murine MHC [61,62]. T-cells that exit the CD34<sup>+</sup>NSG mouse “thymic organoid” thus may recognize foreign (mouse) as well as self- (human) derived epitopes on self and mouse MHC. Thus they may display “proper” restriction to human MHC and be tolerant to human and/or murine peptides but may feature functional impairment due to the lack of costimulatory signals on host-derived dendritic cells in the periphery, while experiencing proper activation on human APCs. These mice may also generate T cell repertoires reactive against murine peptides not present within the AIRE (autoimmune regulatory gene)-negative thymoid (not shown) but the periphery thus contributing to the risk of “(xeno-) autoimmunity”. The presentation of different peptide repertoires rather than differences in HLA-molecule T-cell-recognition-site sequences seem important also in clinical cGVHD, as the number of disparate haplotypes rather than the number of disparate alleles significantly influences the occurrence of cGVHD [63]. Analogously, murine models of cGVHD sampling clinical settings are MHC-matched but differ in numerous minor histocompatibility antigens [64]. A peptide repertoire-specific T-cell reactivity in CD34<sup>+</sup>cGVHD NSG mice rather than

responsiveness to xenogeneic MHC complex is also suggested by the fact that the classical targets of aGVHD, ileum and colon, were clearly less affected than lung, liver and skin.

Moreover, the activation of T cells seems antigen driven [65,66] conforming with the TCR $\alpha$  repertoires of lung and skin that were heavily skewed towards clonal expansions with few clones present in more than one diseased organ. This indicates tissue-specific T-cell responses to respective peptide repertoires. Finally, the CDR3 regions of clonally expanded T cells, the region of the TCR that binds the epitope, featured attributes of autoimmune TCRs with germline-encoded as well as hydrophobic motifs [10–12]. Moreover, we found oligoclonal expansions of V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T cells with the same WGI motif in all individuals examined, possibly indicating an antigenic pressure that may have shaped the repertoire. Intriguingly, clonally expanded  $\gamma\delta$  T cells accumulate in the skin of systemic sclerosis patients [14,67] where they enhance pro $\alpha$ 2(I) collagen expression in fibroblasts, suggesting that  $\gamma\delta$  T cells may play an important role in fibrotic processes [68]. Thus, there is broad molecular evidence for a highly complex immune compartment that in the CD34<sup>+</sup>NSG cGVHD cohort is able to provoke an autoimmune response and phenotype comparable to that described for rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease [69] and autoimmune scleroderma [68,70] in the absence of any FoxP3<sup>+</sup> or B cells.

While the BLT NSG is prone for cGVHD [19,71], this disease has not been reported in CD34<sup>+</sup>-humanized NSG mice. The explicit difference in cGVHD incidences in the same NSG mouse strain immediately points to differences in the mode of humanization that may contribute to susceptibility for “(xeno-) autoimmunity”. Indeed, as outlined above, T-cell-educating/selecting processes in the CD34<sup>+</sup>NSG differ from those in BLT NSG mice. “Central tolerance” to xenogeneic host tissue is rather established in the CD34<sup>+</sup> but not in BLT NSG mice that educate T cells on human thymic stroma. This may explain the dramatically reduced risk for cGVHD in CD34<sup>+</sup>NSG mice to some extent. Yet, as “central tolerance” can also be broken in the CD34<sup>+</sup> humanized NSG mouse, factors discriminating diseased versus non-diseased cohorts seem to matter in the pathophysiology of cGVHD in CD34<sup>+</sup>NSG mice.

Inefficient “thymic” negative selection [72,73] can be excluded as it is the same in all CD34<sup>+</sup> humanized NSG cohorts. Also, the involvement of B cells can be dismissed, since CD34<sup>+</sup>NSG mice engrafted in the presence of FcIL-7 show marginal or even lacking B-cell compartments. Congruently, immune-complex glomerulonephritis resulting from deposition of autoantibodies [74] was not observed (not shown). Also nonfunctional nTreg cells can be excluded as all CD34<sup>+</sup>NSG mice lack Hassall’s corpuscles [75]. Sequentially, FoxP3 transcripts were – if at all – marginally present in diseased and all other CD34<sup>+</sup>NSG cohorts. This finding significantly contrasts the BLT NSG mouse, where Hassall’s corpuscles confer the generation of nTreg cells and the frequency of FoxP3<sup>+</sup> thymocytes highly correlates with the severity of the disease [76]. Thus, the only factor discriminating diseased versus non-diseased CD34<sup>+</sup>NSG cohorts was the HLA type of the grafts. Despite the presence of single HLA alleles that associate with a higher risk for autoimmune diseases such as TD1, JIA, AIH, PV, MS, Narcolepsy and celiac disease, none of the recipients receiving these grafts developed cGVHD. Importantly, as we report here for the first time, two human autoimmunity susceptibility extended HLA-haplotypes (HASEH) differing in all alleles – yet both known to make prone to autoimmunity – were able to induce systemic sclerodermatous GVHD in CD34<sup>+</sup>NSG mice. Interestingly in one of the cohorts, disease developed later and the number of affected individuals was significantly lower. cGVHD cohort II developed disease 28 weeks after transplantation and in only 3 of 35 graft recipients (8.57%)



**Table 4**  
cGVHD-inducing grafts' HLA types. The respective single HLA ligands association with autoimmune disease(s) are referenced as well as the extended haplotypes (marked in grey) association with increased risk for psoriasis (graft 1) and psoriasis and rheumatoid arthritis (graft 2). Grafts were **not** pooled.

	HLA	Autoimmune disease	Ref
<b>Transplant haplotype of diseased cohort</b>	<b>1</b>	Cw*0602	Psoriasis [20–22]
		DRB1*0701	Vitiligo [23,24]
			Psoriasis [25,26]
			Crohn's disease [27]
			Autoimmune hepatitis (AIH) type 2 [27]
			Primary biliary cirrhosis [27]
			Celiac disease [27]
		DRB1*15	Multiple sclerosis [28]
			Narcolepsy [29]
			Primary sclerosing cholangitis [27]
	<b>2</b>	DQB1*0303	Ulcerative colitis [27]
			Type 1 diabetes [30]
			Autoimmune hepatitis (AIH) type 2 [31]
			Type 1 diabetes [32]
			Primary biliary cirrhosis [27]
		DQB1*0602	Multiple sclerosis and disease severity [33,34]
			Narcolepsy [35]
			Primary sclerosing cholangitis [27]
			Autoimmune hepatitis (AIH) type1/2 [27]
			Rheumatoid arthritis [36]
	Extended susceptibility haplotype for psoriasis [37]		
	Psoriasis [38]		
	Primary sclerosing cholangitis [27]		
	Rheumatoid arthritis [39]		
	Pemphigus vulgaris [40]		
DRB1*0301	Type 1 diabetes [41]		
	Autoimmune hepatitis (AIH) type 1 [42,43]		
DQB1*0501	Crohn's disease [27]		
	Type 1 diabetes [44]		
DQB1*0502	Pemphigus vulgaris [45]		
	Acquired haemophilia [46]		
	Extended Susceptibility Haplotype for Rheumatoid arthritis [47]		
	Psoriasis [38]		

**Table 5**  
HLA class I and II alleles of 15 CD34<sup>+</sup> stem cell grafts that were used for humanizing NSG cohorts. cGVHD-inducing grafts D1, D2 (D = disease causing) are given in the first two lines. Extended susceptibility HLA Haplotypes for Psoriasis in D1 and D2 are highlighted in grey (haplotype cohort 1: Cw\*602/DRB1\*0701/DQB1\*0303; haplotype cohort 2: Cw\*08x/DRB1\*0102/DQB1\*0501). Grafts 1–13: HLA ligands that are present in disease-inducing grafts but are not associated with increased risk for psoriasis are given in bold (**bold**), HLA ligands that are present in disease-inducing grafts and associated with increased risk for psoriasis are highlighted in grey (**bold**). cGVHD-inducing grafts share up to three HLA class I and/or class II alleles with non-pathogenic grafts. None of the 13 grafts that did not induce cGVHD shared a complete susceptibility HLA haplotype with either graft D1 or D2. (n.d.: no data).

Graft	HLA-A	HLA-B	HLA-C	DRB1	DQB1
<b>D1</b>	<b>A*0301</b>	<b>A*0301</b>	<b>B*0702</b>	<b>B*5701</b>	Cw*0602
<b>D2</b>	<b>A*02x</b>	<b>A*32x</b>	<b>B*14x</b>	<b>B*4001</b>	Cw*03x
1	A*01x	<b>A*03x</b>	B*08x	B*38x	n.d.
2	A*30x	A*68x	B*27x	<b>B*57x</b>	n.d.
3	<b>A*02x</b>	<b>A*03x</b>	B*47x	B*51x	n.d.
4	A*01x	<b>A*02x</b>	B*08x	B*35x	n.d.
5	<b>A*02x</b>	A*24x	B*40x	B*44x	Cw*02x
6	<b>A*02x</b>	A*26x	B*07x	B*55x	n.d.
7	<b>A*02x</b>	<b>A*03x</b>	B*35x	B*56x	n.d.
8	A*01x	<b>A*02x</b>	B*08x	<b>B*40x</b>	n.d.
9	A*23x	A*25x	B*18	B*18	Cw*12x
10	A*01x	<b>A*03x</b>	B*08x	B*51x	Cw*0701
11	A*01x	A*11x	B*13x	B*27x	Cw*02x
12	A*26x	A*33x	B*50x	<b>B*57x</b>	Cw*04x
13	A*24x	A*30x	B*42x	B*81x	Cw*17x

compared to 30 of 71 (42%) recipients 24 weeks post graft receipt in cohort I. A lucid explanation may be that in cohort II two class I alleles (B1401, A3201) that in the BLT mouse showed significant protective effects were co-expressed with the risk haplotype.

Severe cGVHD in the absence of FoxP3<sup>+</sup> nTreg and B cells emphasizes the key role of auto reactive T-cell development and non-T cell mediated pathways (cytokines) in the pathogenesis of human cGVHD [64]. However, the identification of exactly those factors

that specifically account for break of tolerance and autoimmunity in many but not all syngeneic individuals remains a challenge.

## 5. Conclusions

We demonstrate for the first time that human autoimmunity susceptibility extended HLA-haplotypes (HASEH) are sufficient to evoke related disease even in a xenogeneic environment. This

astonishing finding has major implications. Coordinated or randomly selected HLA class I and II alleles, haplotypes and/or single nucleotide polymorphism mutations [77–79] that make humans prone to autoimmunity and/or cGVHD [80] may now be inspected in the CD34<sup>+</sup>NSG mouse for a more complete understanding of their role in disease. Thus this new *in vivo* model, the (HASEH)-CD34<sup>+</sup>NSG mouse – alone or in comparative analysis with the BLT NSG mouse – may help to illuminate the pathogenesis of cGVHD and to evaluate new concepts for the prevention and treatment of autoimmune diseases.

### Disclosure of interest

The authors state no competing financial interests.

### Acknowledgements

KS and CW were supported by a grant provided by the Jürgen Manchot Foundation. Laboratory Work was funded by the Stiftung für krebskranke Kinder Tübingen e.V. and the Jose-Carreras Leukemia Foundation and the Stefan Morsch Stiftung.

### References

- [1] Y.W. Chu, R.E. Gress, Murine models of chronic graft-versus-host disease: insights and unresolved issues, *Biol. Blood Marrow Transpl.* 14 (2008) 365–378.
- [2] R. Korngold, J. Sprent, Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow, *J. Exp. Med.* 148 (1978) 1687–1698.
- [3] J. Sprent, M. Schaefer, D. Lo, R. Korngold, Properties of purified T cell subsets. II. *In vivo* responses to class I vs. class II H-2 differences, *J. Exp. Med.* 163 (1986) 998–1011.
- [4] C. Zhang, I. Todorov, Z. Zhang, Y. Liu, F. Kandeel, S. Forman, et al., Donor CD4<sup>+</sup> T and B cells in transplants induce chronic graft-versus-host disease with autoimmune manifestations, *Blood* 107 (2006) 2993–3001.
- [5] Y. Zhang, L.L. McCormick, S.R. Desai, C. Wu, A.C. Gilliam, Murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma: cutaneous cytokines, chemokines, and immune cell activation, *J. Immunol.* 168 (2002) 3088–3098.
- [6] K. Schilbac, M. Alkhale, C. Welke, F. Eckert, G. Blank, H. Ziegler, M. Sterk et al. Cancer-targeted IL-12 controls human rhabdomyosarcoma by senescence-induction and myogenic differentiation *Oncoimmunology*, accepted for publication <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1014760>.
- [7] K.C. Garcia, J.J. Adams, D. Feng, L.K. Ely, The molecular basis of TCR germline bias for MHC is surprisingly simple, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 143–147.
- [8] M. Nakayama, T. Castoe, T. Sosinowski, X. He, K. Johnson, K. Haskins, et al., Germline TRAV5D-4 T-cell receptor sequence targets a primary insulin peptide of NOD mice, *Diabetes* 61 (2012) 857–865.
- [9] Y. Yin, Y. Li, R.A. Mariuzza, Structural basis for self-recognition by autoimmune T-cell receptors, *Immunol. Rev.* 250 (2012) 32–48.
- [10] N. Ali, B. Flutter, R. Sanchez Rodriguez, E. Sharif-Paghaleh, L.D. Barber, G. Lombardi, et al., Xenogeneic graft-versus-host-disease in NOD-scid IL-2Rγ<sup>−/−</sup> mice display a T-effector memory phenotype, *PLoS One* 7 (2012) e44219.
- [11] K.D. Bourcier, D.G. Lim, Y.H. Ding, K.J. Smith, K. Wucherpfennig, D.A. Hafler, Conserved CDR3 regions in T-cell receptor (TCR) CD8(+) T cells that recognize the Tax11-19/HLA-A\*0201 complex in a subject infected with human T-cell leukemia virus type 1: relationship of T-cell fine specificity and major histocompatibility complex/peptide/TCR crystal structure, *J. Virol.* 75 (2001) 9836–9843.
- [12] T. Kondo, T. Yamamura, J. Inobe, T. Ohashi, K. Takahashi, T. Tabira, TCR repertoire to proteolipid protein (PLP) in multiple sclerosis (MS): homologies between PLP-specific T cells and MS-associated T cells in TCR junctional sequences, *Int. Immunol.* 8 (1996) 123–130.
- [13] Y. Kita, K. Kuroda, T. Mimori, T. Hashimoto, K. Yamamoto, Y. Saito, et al., T cell receptor clonotypes in skin lesions from patients with systemic lupus erythematosus, *J. Invest. Dermatol.* 110 (1998) 41–46.
- [14] B. White, V.V. Yurovsky, Oligoclonal expansion of V delta 1+ gamma/delta T-cells in systemic sclerosis patients, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 756 (1995) 382–391.
- [15] N. Fujishima, M. Hirokawa, M. Fujishima, J. Yamashita, H. Saitoh, Y. Ichikawa, et al., Skewed T cell receptor repertoire of Vdelta1(+) gammadelta T lymphocytes after human allogeneic haematopoietic stem cell transplantation and the potential role for Epstein-Barr virus-infected B cells in clonal restriction, *Clin. Exp. Immunol.* 149 (2007) 70–79.
- [16] T. Kawase, Y. Morishima, K. Matsuo, K. Kashiwase, H. Inoko, H. Saji, et al., High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism, *Blood* 110 (2007) 2235–2241.
- [17] T. Sasazuki, T. Juji, Y. Morishima, N. Kinukawa, H. Kashiwabara, H. Inoko, et al., Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. Japan Marrow Donor Program, *N. Engl. J. Med.* 339 (1998) 1177–1185.
- [18] E.Y. Jones, L. Fugger, J.L. Strominger, C. Siebold, MHC class II proteins and disease: a structural perspective, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 271–282.
- [19] M.B. Greenblatt, V. Vrbanac, T. Tivey, K. Tsang, A.M. Tager, A.O. Aliprantis, Graft versus host disease in the bone marrow, liver and thymus humanized mouse model, *PLoS One* 7 (2012) e44664.
- [20] A. Poma, G. Carlucci, G. Fontecchio, Immunogenetics and HPLC analyses contribute to understanding the etiopathology of rheumatoid arthritis through studies on ancient human remains, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 25 (2012) 1075–1082.
- [21] M. Kastelan, F. Gruber, E. Cecuk, V. Kerhin-Brkljatic, L. Brkljatic-Surkalovic, A. Kastelan, Analysis of HLA antigens in Croatian patients with psoriasis, *Acta Dermatol. Venereol. Suppl.* (2000) 12–13.
- [22] E. Mallon, M. Bunce, F. Wojnarowska, K. Welsh, HLA-CW\*0602 is a susceptibility factor in type I psoriasis, and evidence Ala-73 is increased in male type I psoriatics, *J. Invest. Dermatol.* 109 (1997) 183–186.
- [23] D.Y. Hu, Y.Q. Ren, K.J. Zhu, Y.M. Lv, H. Cheng, Z. Zhang, et al., Comparisons of clinical features of HLA-DRB1\*07 positive and negative vitiligo patients in Chinese Han population, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 25 (2011) 1299–1303.
- [24] R.A. Spritz, Six decades of vitiligo genetics: genome-wide studies provide insights into autoimmune pathogenesis, *J. Invest. Dermatol.* 132 (2012) 268–273.
- [25] M. Schmitt-Egenolf, W.H. Boehncke, M. Stander, T.H. Eiermann, W. Sterry, Oligonucleotide typing reveals association of type I psoriasis with the HLA-DRB1\*0701/2, -DQA1\*0201, -DQB1\*0303 extended haplotype, *J. Invest. Dermatol.* 100 (1993) 749–752.
- [26] S.H. Jee, T.F. Tsai, W.L. Tsai, S.H. Liaw, C.H. Chang, C.Y. Hu, HLA-DRB1\*0701 and DRB1\*1401 are associated with genetic susceptibility to psoriasis vulgaris in a Taiwanese population, *Br. J. Dermatol.* 139 (1998) 978–983.
- [27] A. Cassinotti, S. Birindelli, M. Clerici, D. Trabattani, M. Lazzaroni, S. Ardizzone, et al., HLA and autoimmune digestive disease: a clinically oriented review for gastroenterologists, *Am. J. Gastroenterol.* 104 (2009) 195–217 quiz 194, 218.
- [28] A.K. Hedstrom, I. Lima Bomfim, L. Barcellos, M. Gianfrancesco, C. Schaefer, I. Kockum, et al., Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis, *Neurology* 82 (2014) 865–872.
- [29] F. Han, L. Lin, J. Li, S.X. Dong, P. An, L. Zhao, et al., HLA-DQ association and allele competition in Chinese narcolepsy, *Tissue Antigens* 80 (2012) 328–335.
- [30] Y. Ghodke, K. Joshi, A. Chopra, B. Patwardhan, HLA and disease, *Eur. J. Epidemiol.* 20 (2005) 475–488.
- [31] A.A. Elfaramawy, R.M. Elhossiny, A.A. Abbas, H.M. Aziz, HLA-DRB1 as a risk factor in children with autoimmune hepatitis and its relation to hepatitis A infection, *Ital. J. Pediatr.* 36 (2010) 73.
- [32] K. Hashimoto, H. Maruyama, M. Nishiyama, K. Asaba, Y. Ikeda, T. Takao, et al., Susceptibility alleles and haplotypes of human leukocyte antigen DRB1, DQA1, and DQB1 in autoimmune polyglandular syndrome type III in Japanese population, *Horm. Res.* 64 (2005) 253–260.
- [33] P. Cruz-Tapias, O.M. Perez-Fernandez, A. Rojas-Villarraga, A. Rodriguez-Rodriguez, M.T. Arango, J.M. Anaya, Shared HLA class II in six autoimmune diseases in Latin America: a meta-analysis, *Autoimmune Dis.* 2012 (2012) 569728.
- [34] A. Kollae, M. Ghaffarpour, H.A. Ghlichnia, S.H. Ghaffari, M. Zamani, The influence of the HLA-DRB1 and HLA-DQB1 allele heterogeneity on disease risk and severity in Iranian patients with multiple sclerosis, *Int. J. Immunogenet.* 39 (2012) 414–422.
- [35] S. Cingoz, S. Agilkaya, I. Oztura, S. Eroglu, D. Karadeniz, A. Evlice, et al., Identification of the variations in the CPT1B and CHKB genes along with the HLA-DQB1\*06:02 allele in Turkish narcolepsy patients and healthy persons, *Genet. Test. Mol. Biomarkers* 18 (2014) 261–268.
- [36] A.G. Muazzam, A. Mansoor, L. Ali, S. Siddiqi, A. Hameed, M. Ajmal, et al., Association of HLA-DRB1 and -DQB1 alleles and haplotypes with rheumatoid arthritis in a Pakistani population, *Arthritis Res. Ther.* 15 (2013) R95.
- [37] C. Choonhakarn, A. Romphruk, C. Puapairoj, K. Jirattapanochai, A. Romphruk, C. Leelayuwat, Haplotype associations of the major histocompatibility complex with psoriasis in Northeastern Thais, *Int. J. Dermatol.* 41 (2002) 330–334.
- [38] S. Jenisch, R.P. Nair, T. Henseler, J.T. Elder, B. Marxen, M. Krönke, et al., Association of type I psoriasis with the Cw\*0802-DRB1\*0102-DQB1\*0501 haplotype in north-american multiplex families, *Hum. Immunol.* 47 (1996) 29.
- [39] N. de Vries, K.S. Ronningen, M.G. Tilanus, A. Bouwens-Rombouts, R. Segal, T. Egeland, et al., HLA-DR1 and rheumatoid arthritis in Israeli Jews: sequencing reveals that DRB1\*0102 is the predominant HLA-DR1 subtype, *Tissue Antigens* 41 (1993) 26–30.
- [40] P. Loiseau, L. Lecleach, C. Prost, V. Lepage, M. Busson, S. Bastuji-Garin, et al., HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus, *J. Autoimmun.* 15 (2000) 67–73.
- [41] M.H. Black, J.M. Lawrence, C. Pihoker, L.M. Dolan, A. Anderson, B. Rodriguez, et al., HLA-associated phenotypes in youth with autoimmune diabetes, *Pediatr. Diabetes* 14 (2013) 121–128.

- [42] L.C. Oliveira, G. Porta, M.L. Marin, P.L. Bittencourt, J. Kalil, A.C. Goldberg, Autoimmune hepatitis, HLA and extended haplotypes, *Autoimmun. Rev.* 10 (2011) 189–193.
- [43] Y.S. de Boer, N.M. van Gerven, A. Zwieters, B.J. Verwer, B. van Hoek, K.J. van Erpecum, et al., Genome-wide association study identifies variants associated with autoimmune hepatitis type 1, *Gastroenterology* 147 (2014) 443–452 e5.
- [44] A. Rojas-Villarraga, D. Botello-Corzo, J.M. Anaya, HLA-Class II in Latin American patients with type 1 diabetes, *Autoimmun. Rev.* 9 (2010) 666–673.
- [45] S. Shams, A.A. Amirzargar, M. Yousefi, N. Rezaei, G. Solgi, F. Khosravi, et al., HLA class II (DRB, DQA1 and DQB1) allele and haplotype frequencies in the patients with pemphigus vulgaris, *J. Clin. Immunol.* 29 (2009) 175–179.
- [46] J. Oldenburg, H. Zeitler, A. Pavlova, Genetic markers in acquired haemophilia, *Haemophilia* 16 (Suppl. 3) (2010) 41–45.
- [47] S.L. Bridges Jr., J.M. Kelley, L.B. Hughes, The HLA-DRB1 shared epitope in Caucasians with rheumatoid arthritis: a lesson learned from tic-tac-toe, *Arthritis Rheumat.* 58 (2008) 1211–1215.
- [48] D. Catanzaro, M. Andrien, M. Labbe, M. Toungouz-Nevevsignsky, Computer-aided human leukocyte antigen association studies: a case study for psoriasis and severe alopecia areata, *Hum. Immunol.* 71 (2010) 783–788.
- [49] M. Schmitt-Egenolf, T.H. Eiermann, W.H. Boehncke, M. Stander, W. Sterry, Familial juvenile onset psoriasis is associated with the human leukocyte antigen (HLA) class I side of the extended haplotype Cw6-B57-DRB1\*0701-DQA1\*0201-DQB1\*0303: a population- and family-based study, *J. Invest. Dermatol.* 106 (1996) 711–714.
- [50] P.J. Martin, G.W. Counts Jr., F.R. Appelbaum, S.J. Lee, J.E. Sanders, H.J. Deeg, et al., Life expectancy in patients surviving more than 5 years after hematopoietic cell transplantation, *J. Clin. Oncol.* 28 (2010) 1011–1016.
- [51] J.R. Wingard, N.S. Majhail, R. Brazauskas, Z. Wang, K.A. Sobocinski, D. Jacobsohn, et al., Long-term survival and late deaths after allogeneic hematopoietic cell transplantation, *J. Clin. Oncol.* 29 (2011) 2230–2239.
- [52] G. Socie, J. Ritz, Current issues in chronic graft-versus-host disease, *Blood* 124 (2014) 374–384.
- [53] S.M. Jaglowski, S.M. Devine, Graft-versus-host disease: why have we not made more progress? *Curr. Opin. Hematol.* 21 (2014) 141–147.
- [54] B.S. Baker, A.F. Swain, L. Fry, H. Valdimarsson, Epidermal T lymphocytes and HLA-DR expression in psoriasis, *Br. J. Dermatol.* 110 (1984) 555–564.
- [55] J.R. Bjerke, H.K. Krogh, R. Matre, Characterization of mononuclear cell infiltrates in psoriatic lesions, *J. Invest. Dermatol.* 71 (1978) 340–343.
- [56] R.E. Champlin, N. Schmitz, M.M. Horowitz, B. Chappuis, R. Chopra, J.J. Cornelissen, et al., Blood stem cells compared with bone marrow as a source of hematopoietic cells for allogeneic transplantation. IBMT histocompatibility and stem cell sources working committee and the European group for blood and marrow transplantation (EBMT), *Blood* 95 (2000) 3702–3709.
- [57] D.M. Brainard, E. Seung, N. Frahm, A. Cariappa, C.C. Bailey, W.K. Hart, et al., Induction of robust cellular and humoral virus-specific adaptive immune responses in human immunodeficiency virus-infected humanized BLT mice, *J. Virol.* 83 (2009) 7305–7321.
- [58] M.W. Melkus, J.D. Estes, A. Padgett-Thomas, J. Gatlin, P.W. Denton, F.A. Othieno, et al., Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1, *Nat. Med.* 12 (2006) 1316–1322.
- [59] N. Tonomura, K. Habiro, A. Shimizu, M. Sykes, Y.G. Yang, Antigen-specific human T-cell responses and T cell-dependent production of human antibodies in a humanized mouse model, *Blood* 111 (2008) 4293–4296.
- [60] B. Zhang, Z. Duan, Y. Zhao, Mouse models with human immunity and their application in biomedical research, *J. Cell. Mol. Med.* 13 (2009) 1043–1058.
- [61] L. Covassin, J. Laning, R. Abdi, D.L. Langevin, N.E. Phillips, L.D. Shultz, et al., Human peripheral blood CD4 T cell-engrafted non-obese diabetic-scid IL2r-gamma(null) H2-Ab1 (tm1Gru) Tg (human leukocyte antigen D-related 4) mice: a mouse model of human allogeneic graft-versus-host disease, *Clin. Exp. Immunol.* 166 (2011) 269–280.
- [62] M.A. King, L. Covassin, M.A. Brehm, W. Racki, T. Pearson, J. Leif, et al., Human peripheral blood leukocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex, *Clin. Exp. Immunol.* 157 (2009) 104–118.
- [63] R. Mika-Witkowska, Acute and chronic GvHD are differently influenced by the level of HLA allelic and haplotypic disparity: a Polish Immunogenetics Study Group, *Tissue Antigens* 81 (2013) 307–308.
- [64] T.A. Wynn, Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 583–594.
- [65] L.I. Sakkas, C.D. Platsoucas, Is systemic sclerosis an antigen-driven T cell disease? *Arthritis Rheumatism* 50 (2004) 1721–1733.
- [66] L.I. Sakkas, B. Xu, C.M. Artlett, S. Lu, S.A. Jimenez, C.D. Platsoucas, Oligoclonal T cell expansion in the skin of patients with systemic sclerosis, *J. Immunol.* 168 (2002) 3649–3659.
- [67] R. Giacomelli, M. Matucci-Cerinic, P. Cipriani, I. Ghersetich, R. Lattanzio, A. Pavan, et al., Circulating Vdelta1+ T cells are activated and accumulate in the skin of systemic sclerosis patients, *Arthritis Rheumat.* 41 (1998) 327–334.
- [68] I. Ueda-Hayakawa, M. Hasegawa, Y. Hamaguchi, K. Takehara, M. Fujimoto, Circulating gamma/delta T cells in systemic sclerosis exhibit activated phenotype and enhance gene expression of proalpha2(1) collagen of fibroblasts, *J. Dermatol. Sci.* 69 (2013) 54–60.
- [69] R.C. Keith, J.L. Powers, E.F. Redente, A. Sergew, R.J. Martin, A. Ginzinski, et al., A novel model of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease in SKG mice, *Exp. Lung Res.* 38 (2012) 55–66.
- [70] D.L. Huu, T. Matsushita, G. Jin, Y. Hamaguchi, M. Hasegawa, K. Takehara, et al., FTY720 ameliorates murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease by promoting expansion of splenic regulatory cells and inhibiting immune cell infiltration into skin, *Arthritis Rheumat.* 65 (2013) 1624–1635.
- [71] J.L. Lockridge, Y. Zhou, Y.A. Becker, S. Ma, S.C. Kenney, P. Hematti, et al., Mice engrafted with human fetal thymic tissue and hematopoietic stem cells develop pathology resembling chronic graft-versus-host disease, *Biol. Blood Marrow Transpl.* 19 (2013) 1310–1322.
- [72] T. Wu, J.S. Young, H. Johnston, X. Ni, R. Deng, J. Racine, et al., Thymic damage, impaired negative selection, and development of chronic graft-versus-host disease caused by donor CD4+ and CD8+ T cells, *J. Immunol.* 191 (2013) 488–499.
- [73] A. Lawitschka, L. Ball, C. Peters, Nonpharmacologic treatment of chronic graft-versus-host disease in children and adolescents, *Biol. Blood Marrow Transpl.* 18 (2012) S74–S81.
- [74] S. Svegliati, A. Olivieri, N. Campelli, M. Luchetti, A. Poloni, S. Trappolini, et al., Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease, *Blood* 110 (2007) 237–241.
- [75] N. Watanabe, Y.H. Wang, H.K. Lee, T. Ito, Y.H. Wang, W. Cao, et al., Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus, *Nature* 436 (2005) 1181–1185.
- [76] T. Onoe, H. Kalscheuer, N. Danzl, M. Chittenden, G. Zhao, Y.G. Yang, et al., Human natural regulatory T cell development, suppressive function, and postthymic maturation in a humanized mouse model, *J. Immunol.* 187 (2011) 3895–3903.
- [77] J.W. Chien, L.P. Zhao, B. Storer, P.J. Martin, M. Boeckh, E.H. Warren, et al., Improving hematopoietic cell transplant outcomes in a new era of genomic research, *Biol. Blood Marrow Transpl.* 15 (2009) 42–45.
- [78] A. Takami, J.L. Espinoza, M. Onizuka, K. Ishiyama, T. Kawase, Y. Kanda, et al., A single-nucleotide polymorphism of the Fc-gamma receptor type IIIA gene in the recipient predicts transplant outcomes after HLA fully matched unrelated BMT for myeloid malignancies, *Bone Marrow Transpl.* 46 (2011) 238–243.
- [79] A.M. Vannucchi, S. Guidi, P. Guglielmelli, S. Glinz, L. Lombardini, A. Busca, et al., Significance of CTLA-4 and CD14 genetic polymorphisms in clinical outcome after allogeneic stem cell transplantation, *Bone Marrow Transpl.* 40 (2007) 1001–1002.
- [80] E.W. Petersdorf, M. Malkki, M.M. Horowitz, S.R. Spellman, M.D. Haagenson, T. Wang, Mapping MHC haplotype effects in unrelated donor hematopoietic cell transplantation, *Blood* 121 (2013) 1896–1905.