

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie und Onkologie)

**Epigenetische Modulation der Tumor-spezifischen
Antigen-Expression in Kombination mit Immun-
Checkpoint-Inhibitoren für den adoptiven T-Zelltransfer
in pädiatrischen Sarkompatienten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Ruisinger, Lisa Teresa

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. C. Gouttefangeas

Tag der Disputation: 07.09.2020

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	18
1.1	Das Immunsystem und Krebsentstehung	18
1.2	Immuntherapien	20
1.3	Sarkome	38
1.4	Ziele der Arbeit	47
2	MATERIAL UND METHODEN	48
2.1	Allgemeine Zellkulturmethoden	48
2.2	Durchflusszytometrie	51
2.3	Analyse der Tumorzelllinien	55
2.4	Generierung von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen und Dendritischen Zellen	61
2.5	Analyse der generierten T-Zellen	67
3	ERGEBNISSE	71
3.1	Identifizierung von spezifischen Tumorantigenen in Sarkom- und Melanomzelllinien	71
3.2	Epigenetische Modulation der Tumor-Antigen-Expression	73
3.3	Generierung von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen von T-Zellspendern	77
3.4	Tumorantigen-spezifische Proliferation der CD4 ⁺ T _H 1-Zellen	85
3.5	Einfluss von Immun-Checkpoint-Inhibitoren auf die Tumorantigen-spezifischen T-Zellen	88

3.6	Expression der Immun-Checkpoints der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen	90
3.7	Wirkungsweise der Tumorantigen-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen auf Tumorzelllinien	93
4	DISKUSSION	100
4.1	Tumorantigen-Expression und deren epigenetische Modulation	101
4.2	Generierung von Tumorantigen-spezifischen CD4 ⁺ T _H 1 Zellen und deren zytotoxisches Potential	103
4.3	Proliferationspotential der Tumorantigen-spezifischen CD4 ⁺ T _H 1 Zellen	106
4.4	Expression der Immun-Checkpoints der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4 ⁺ T _H 1 Zellen	107
4.5	Divergierende Wirkung von Immun-Checkpoint-Inhibitoren auf das zytotoxische und Proliferationspotential der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4 ⁺ T _H 1 Zellen	109
4.6	Induktion von Seneszenz der Tumorantigen-spezifischen CD4 ⁺ T _H 1 Zellen bei der Melanomzelllinie WM115	111
4.7	Keine Induktion von Seneszenz beim Ewing Sarkom RDES mittels IFN- γ und TNF- α möglich	113
4.8	Schlussfolgerungen	114
5	ZUSAMMENFASSUNG	116
6	LITERATURVERZEICHNIS	119
7	ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	136
7	VERÖFFENTLICHUNG	137
8	DANKSAGUNG	138

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Methylierung von Cytosin (Herman and Baylin, 2003).....	35
Abbildung 2: Standardkonfiguration LSR II (BD)	52
Abbildung 3: Standard Gating Hierarchie	55
Abbildung 4: Umwandlung von MTS in Formazan (Reduktion mittels NADH/NADPH)	56
Abbildung 5: Generierung von Tumor-Antigen-spezifischen T-Zellen	63
Abbildung 6: ROR-1 Expression von Ewing, Osteo- und Rhabdomyosarkomen, sowie Melanomen.	72
Abbildung 7: Ermittlung der optimalen Decitabine-Konzentration.....	74
Abbildung 8: Expression der Tumorantigene MAGE-A1, MAGE-A3, NY-ESO-1 und PRAME.....	76
Abbildung 9: Zellzahlen der fünf unabhängigen Generierungen von Tumorantigen-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des Herstellungsprotokolls.	80
Abbildung 10: T _H 1 Zytokinprofil der generierten PRAME (1) spezifischen T-Zellen.	83
Abbildung 11: Zytotoxisches Potential der generierten PRAME (1) spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (Granzyme B; %).	85
Abbildung 12: Proliferationspotential (CFSE ⁻) der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (Ktr.).....	86
Abbildung 13: Proliferationspotential (CFSE ⁻) der PRAME (1) spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen und deren IFN- γ Sekretion im Vergleich zur Negativkontrolle (MOG).87	

Abbildung 14: Effekt der Immun-Checkpoint-Inhibition mittels PD1 auf das zytotoxische Potential der CD4 ⁺ T-Zellen, verglichen mit dem zytotoxischen Potential ohne Zugabe des blockierenden Antikörpers PD1 (Ø).	89
Abbildung 15: Proliferationspotential (CFSE ⁻) und IFN-γ abhängige Proliferation (IFN-γ ⁺ /CFSE ⁻) mit und ohne Immun-Checkpoint-Inhibition (PD1) in Prozent. .	90
Abbildung 16: Expression der Immun-Checkpoints PD1, LAG3, TIM3 und B7-H3 der Tumorantigen-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle im CFSE-Assay in Prozent.	93
Abbildung 17: Induktion von Seneszenz in WM115 mit PRAME (3) spezifischen Überständen (AB-Medium und RPMI+20% FCS).	95
Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse des BrdU-Assays mit Überständen der MAGE-A3 spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen.	96
Abbildung 19: Seneszenzinduktion in der Melanomzelllinie WM115 durch PRAME (1) spezifische Überstände.	97
Abbildung 20: Anzahl vitaler Tumorzellen (WM115) zu Beginn und am Ende des BrdU-Assay, sowie bei zwei Zellpassagen nach Abschluss des Assays (d10 und d15).	98
Abbildung 21: Anhaltende Proliferation des Ewing Sarkoms RDES trotz einer Behandlung mit IFN-γ und TNF-α.....	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Veränderung der Standardlaserkonfiguration des BD™ LSR II bei speziellen Assays	52
Tabelle 2: Fluorochrom-markierte anti-humane Antikörper	54
Tabelle 3: Fluorochrom-markierte Antikörper für Isotypenkontrollen	54
Tabelle 4: Primer mit Sequenzen für die quantitative Real-time PCR	59
Tabelle 5: Antikörper-Panel für das Immunmonitoring	63
Tabelle 6: Antikörper-Panel für die Subphänotypisierung und die Bestimmung der Zytokine.....	68
Tabelle 7: Antikörper-Panel für die Bestimmung intrazellulärer Zytokine und Zelltodmarker	69
Tabelle 8: Antikörper-Panel für die Bestimmung des Proliferationspotentials ..	70
Tabelle 9: Antikörper für die Immuncheckpoint-Inhibition.....	70
Tabelle 10: Zellzahlen (CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ T-Zellen) von Spenderin 1 nach 13-tägiger in vitro Stimulation mit überlappenden Peptidmischen der entsprechenden Tumorantigene.	78
Tabelle 11: Zellzahlen (CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ T-Zellen) von Spenderin 2 nach 11-tägiger in vitro Stimulation mit PRAME-überlappenden Peptidmischen.....	78
Tabelle 12: Zellzahlen (CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ T-Zellen) von Spender 3 nach 11-tägiger in vitro Stimulation mit PRAME-überlappenden Peptidmischen.....	78
Tabelle 13: Zellzahlen zu verschiedenen Zeitpunkten des Protokolls. Der Expansionsfaktor wurde für die Berechnung der Zellzahl nach der Expansion eingesetzt, da teilweise Zellen eingefroren werden mussten.	81

Tabelle 14: Zelltyp in Prozent nach der Anreicherung. Die Prozentzahl der IFN- γ^+ Zellen entspricht dem Prozentsatz an IFN- γ^+ Zellen nach Abzug der Negativkontrolle (MOG).....	82
Tabelle 15: Zelltyp in Prozent nach der 14-tägigen Expansion. Die Prozentzahl der IFN- γ^+ Zellen entspricht dem Prozentsatz an IFN- γ^+ Zellen nach Abzug der Negativkontrolle (MOG).....	82
Tabelle 16: Prozentuale Sekretion von IFN- γ , TNF- α und IL-2 der TA-spezifischen CD4 $^+$ T-Zellen nach Abzug der Negativkontrolle (MOG).	84
Tabelle 17: Vitalität, Proliferationspotential (CFSE $^-$) und IFN- γ^+ Proliferationspotential der Tumorantigen-spezifischen CD4 $^+$ T-Zellen in Prozent.	87
Tabelle 18: Expression der Immun-Checkpoints PD1, LAG3 und TIM3 der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4 $^+$ T-Zellen im CD107a-Assay in Prozent.....	91
Tabelle 19: Expression der Immun-Checkpoints PD1, LAG3, TIM3 und B7-H3 der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4 $^+$ T-Zellen im CFSE-Assay in Prozent.....	92

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
AbC	<i>Antibody compensation (Anti-Mouse-Beads)</i>
AB-Medium	RPMI 1640 Medium mit 10% AB-Serum und 1% L-Glutamin
ACP	Saure Phosphatase
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> (erworbenes Immundefektsyndrom)
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
ALP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APC	<i>Antigen presenting cell</i> (Antigen-präsentierende Zelle)
Aqua a. i.	Aqua ad iniectabilia
Aqua dest.	Aqua destillata
ArC	<i>Amine reactive compensation (Anti-Mouse-Beads)</i>
Bzw.	Beziehungsweise
Ca.	Circa
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Gruppe immunphänotypischer Oberflächenmerkmale)

CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CMV	Humanes Cytomegalievirus
CSA	<i>Cytokine Secretion Assay</i>
CSA-FACS	<i>Catalyzed signal amplification – Fluorescence-activated cell sorting</i>
CT	Computertomographie
CTA	<i>Cancer-Testis-Antigen</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
Cy	Cyanine (Cyanine-Farbstoff)
DC	<i>Dendritic Cell</i> (Dendritische Zelle)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT	DNA-Methyltransferase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	<i>European Medicines Agency</i> (Europäische Arzneimittel-Agentur)
EWS/ES	Ewing Sarkom
Exp.	<i>Expire date</i> (Verfallsdatum)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i> (Fetales Kälberalbumin)

FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fetales Kälberalbumin)
FDA	<i>U. S. Food and Drug Administration</i> (Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelbehörde der Vereinigten Staaten)
FITC	Fluoreszenz-Isothiocyanat
FL	Follikuläres B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom
FMO	<i>Fluorescence minus one</i> (Kontrolle, die unspezifische Signale detektiert)
for.	<i>forward</i> (nach vorne)
FSC	<i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	Relative Zentrifugalkraft
GlutaMAX™-I	Dipeptid aus L-Alanin und L-Glutamin
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GMP	<i>Good manufacturing practice</i> (Gute Herstellungspraxis)
HA	Human-Albumin
HA-Medium	RPMI 1640 Medium mit 10% Human-Albumin und 1% L-Glutamin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Humane Immundefizienz-Virus)
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (Histokompatibilitätsantigen)
HPV	Humane Papillomaviren

ICS	<i>Intracellular cytokine staining</i> (Intrazelluläre Zytokinfärbung)
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LDH	Laktatdehydrogenase
L-Glut	L-Glutamin
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MAGE	<i>Melanoma associated antigen</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
NegFra	Negative Fraktion
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NSCLC	Non small cell lung cancer (Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom)
NY-ESO-1	<i>New York oesophageal squamous cell carcinoma 1</i>
OD	Optische Dichte
OS	Osteosarkom
PET	Positronen-Emissions-Tomographie

PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PBMC	<i>Peripheral-blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PES	<i>Phenazine Ethosulfate</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E2
PI	Propidiumiodid
PosFra	Positive Fraktion
PRAME	<i>Preferentially expressed antigen in melanoma</i>
p53-Gen	p53-Protein (Tumorsuppressor-Protein)
qRT-PCR	quantitative Real-time PCR (Polymerase-Kettenreaktion)
Rb-Gen	Retinoblastom-Protein (Tumorsuppressor-Protein)
Ref.	<i>Reference</i>
rev.	<i>reverse</i> (umkehren/zurückfahren)
RMS	Rhabdomyosarkom
ROR1	<i>Tyrosine kinase-like orphan receptor 1</i>

Rpm	<i>Revolutions per minute</i> (abhängig von der Zentrifugengröße)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute [Medium]
RT	Raumtemperatur
R0-Resektion	Kein Nachweis von malignen Zellen im Resektionsrand des histologischen Präparates bei Tumorentfernungen
SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin-B
SOP	<i>Standard operating procedure</i> (standardisiertes Vorgehen)
SSC	<i>Sideward scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i> (Transkriptionsfaktoren)
SYBR-Green	Asymmetrischer Cyanin-Farbstoff
TA	Tumorantigen
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
Tab.	Tabelle
Taq	Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
T _{CM}	Zentrale T-Gedächtniszelle
T _{EM}	Effektor T-Gedächtniszelle
TexMACS™	Serumfreies Zellkulturmedium für bspw. humane T-Zellen (enthält: stabiles Glutamin, Humanalbumin, Phenolrot)
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten

TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TSA	Tumor-spezifische Antigene
TTA	Tumor-Testis-Antigen
Wnt	Spezieller Signaltransduktionsweg (<i>wingless and int-gene</i>)
ZZ	Zellzählung

SI-EINHEITEN, SI-PRÄFIXE UND ZUM GEBRAUCH MIT DEM SI ZUGELASSENE EINHEITEN

°C	Grad Celcius
g	Gramm
Gy	Gray
h	Stunde(n)
l	Liter
m	Meter
m	Milli-
min	Minute
mol	Mol
μ	Mikro-
n	Nano-
s	Sekunde(n)
U	Unit

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem und Krebsentstehung

Das Immunsystem ist ein vielschichtiges und komplexes Abwehrsystem, welches den Körper vor Mikroorganismen, malignen Zellen, Fremdstoffen und fehlerhaften eigenen Zellen schützt. Es wird in das angeborene und erworbene (adaptive) Immunsystem unterteilt. Die angeborene, unspezifische Immunität tritt bei Kontakt mit einem Krankheitserreger sofort in Aktion, wohingegen die adaptive, spezifische Immunität mehr Zeit benötigt. Das liegt daran, dass die adaptive Immunität, bestehend aus der zellulären und humoralen Immunabwehr, über T- bzw. B-Lymphozyten und Moleküle, wie Zytokine und Antikörper, agiert. Bei der adaptiven zellulären Immunabwehr muss zuerst das Antigen erkannt werden, um anschließend von einer aktivierten Antigen-präsentierenden Zelle (APC) präsentiert werden zu können. Dadurch kommt es zur Interaktion von T-Zellen und deren Aktivierung. Im nächsten Schritt proliferieren die Antigen-spezifischen T-Zellen und können in Effektor- als auch Gedächtniszellen ausdifferenzieren. Die adaptive humorale Immunabwehr läuft hingegen über B-Lymphozyten ab, welche nach der Antigen-Präsentation der APC proliferieren und zur Plasmazelle ausdifferenzieren. Die Plasmazellen sezernieren Antikörper, welche extrazelluläre Toxine und Mikroorganismen bekämpfen (Shore, 2015). Beide Teile des Immunsystems arbeiten Hand in Hand und sind dadurch in der Lage körperfremde Antigene zu erkennen, eine Immunantwort zu initiieren und manche Organismen oder Zellen zu eliminieren.

Das intakte Immunsystem ist einerseits dazu in der Lage Krebszellen mit Hilfe von Immunzellen zu bekämpfen. Dies wird als Immunosurveillance bezeichnet (Burnet, 1970). Andererseits kann das Immunsystem aber auch, durch Selektion der malignen Zellen oder durch Schaffung eines, für die Neoplasie angenehmen Milieus, zu einer Progression dieser beitragen (Dunn et al., 2002, Prestwich et al., 2008, Schreiber et al., 2011, Mittal et al., 2014). Die Interaktion zwischen den malignen Zellen und dem Immunsystem ist ein dynamischer Prozess, welcher

als Immunoediting bezeichnet wird. Bei diesem werden drei Phasen, die Elimination, das Equilibrium und das Escape unterschieden. In der ersten Phase, der Elimination, welche der Immunosurveillance entspricht, erkennt das intakte Immunsystem Tumorzellen bzw. deren Vorstufen und zerstört diese, so dass das Gewebe intakt bleibt. Die Erkennung der Vorstufen bzw. Tumorzellen erfolgt über deren Immunogenität, das bedeutet über deren mutierte Proteine und/oder überexprimierten Tumorantigene. Die Entwicklung der Neoplasie geht in die Phase des Equilibriums über, wenn es dem Immunsystem nicht möglich ist, alle Varianten der Vorstufen bzw. der Tumorzellen zu vernichten. Dadurch liegen im Gewebe maligne Zellen vor, deren Proliferation und Ausbreitung jedoch noch durch das Immunsystem verhindert werden kann. In das dritte Stadium, Escape, tritt der Tumor bzw. die Tumorzellen ein, wenn sie sich durch Anpassungen, wie zum Beispiel verminderte Immunogenität, der Überwachung durch das Immunsystem entziehen. Daraufhin kommt es zur klinisch apparenten, progressiven Tumorerkrankung (Dunn et al., 2002, Teng et al., 2008, Mittal et al., 2014, Shore, 2015, Candeias and Gaipl, 2016).

Ist das Immunsystem nicht intakt, wie zum Beispiel bei immunsupprimierten oder HIV-infizierten Menschen, sind die Prozesse des Immunsystems verändert und es kommt häufiger zu Krebserkrankungen. Immunsupprimierte Patienten haben ein zwei- bis zwanzigfach erhöhtes Risiko eine Krebserkrankung zu bekommen (Shore, 2015). Eine Studie des Oxforder Transplantationszentrums ergab, dass immunsupprimierte nierentransplantierte Menschen acht Mal häufiger an einem Melanom erkranken, als die normale Bevölkerung der Region (Le Mire et al., 2006). HIV-positive Patienten erkrankten ebenfalls häufiger an bestimmten Krebserkrankungen (anorektales Karzinom, Hodgkin Lymphom, Melanom und viele weitere), verglichen mit den Werten der Durchschnittsbevölkerung. Die Inzidenz für Knochenkrebs in einer amerikanischen Studie bei HIV-Patienten lag zum Beispiel bei 2%, wohingegen Knochenkrebs bei der nicht an HIV-erkrankten erwachsenen Bevölkerung nur ca. 1% ausmachte (Burgi et al., 2005). Insgesamt erkrankten ca. 40% der an AIDS erkrankten Personen in ihrem Leben an Krebs (Levine, 1993). Bei einer Erkrankung, bei welcher die Zytotoxizität der Natürlichen Killerzellen verringert ist, wurde ein 200-faches Risiko für die

Entstehung maligner Tumoren festgestellt (Prestwich et al., 2008). Eine weitere Studie kam zu dem Ergebnis, dass das Überleben von krebserkrankten Menschen verlängert ist, wenn der maligne Tumor mit Immunzellen (Tumor-infiltrierende zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten) infiltriert wurde (Sharma et al., 2007). Dies unterstreicht die bedeutende Rolle des Immunsystems in Hinsicht auf die Bekämpfung von Krebs, weswegen das Immunsystem im Kampf gegen maligne Erkrankungen, zum Beispiel mittels Immuntherapien, unterstützt und gestärkt werden sollte.

Im Folgenden werden zunächst kurz Immuntherapien und deren Ansatzpunkte, sowie die Diagnose und Behandlung von Ewing und Osteosarkomen dargestellt. Darauf aufbauend werden die Ziele der Arbeit formuliert.

1.2 Immuntherapien

Der Begriff Immuntherapien subsumiert jegliche Art von Therapie, welche durch Aktivierung des Immunsystems Erkrankungen bekämpft. Die Anfänge der Immuntherapie liegen im Jahr 1891, als der Chirurg William B. Coley einem Patienten mit inoperablem Knochenkrebs Streptokokken injizierte. Auf diese Idee wurde er durch 47 Einzelberichte gebracht, welche besagten, dass es durch Infektionen mit Bakterien (*Treponema pallidum*, Streptokokken) zu geringeren Raten an malignen Erkrankungen bzw. deren Heilung kam. Durch die Injektion von Streptokokken, so die Hypothese Coleys, würden Erysipele hervorgerufen und das Immunsystem aktiviert. Tatsächlich bildete sich der Tumor seines Patienten, vermutlich durch die Aktivierung des Immunsystems, zurück. Coley entwickelte das Toxin weiter, so dass er im Laufe seines Lebens über 1.000 Patienten mit inoperablem Knochen- oder Weichteilkrebs mit dem sogenannten Coley Toxin (Hitze-inaktivierte *Streptokokkus pyogenes* und *Serratia marcescens*) behandelte. Von allen behandelten Patienten bildete sich, je nach Literatur, bei etwa zehn bis fünfzig Prozent der Krebs zurück (McCarthy, 2006, D'Errico et al., 2017). Als weitere Mitbegründer der Immuntherapien sind neben Paul Ehrlich mit seiner Antigen-Theorie (Strebhardt and Ullrich, 2008) sowie Sir Frank Macfarlane Burnet und Peter Medawar mit der Toleranz-Theorie von Krebszellen aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu gesunden Zellen (D'Errico et al., 2017),

noch viele weitere Forscher zu nennen. Ihre Arbeiten führten zum einen zu einem verbesserten Verständnis, wie das Immunsystem funktioniert, und zum anderen förderten sie die Erkennung und Bekämpfung von malignen Zellen und die Entwicklung neuer immunologischer Therapieansätze. Zu diesen zählen zum Beispiel monoklonale Antikörper, Impfungen als Prävention von Krebserkrankungen, adaptiver T-Zelltransfer und Immun-Checkpoint-Inhibition (Topalian et al., 2011, Pardoll and Drake, 2012, Shore, 2015, Pardoll, 2015). Trotz dieser Leistungen und ersten Zulassungen von Immuntherapien, ist auf dem Weg zu einer effektiveren, verlässlichen und sicheren Krebstherapie mittels *magic bullet* noch weitere Forschung zu tätigen (D'Errico et al., 2017). Neben der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten und deren Testung, liegt das Augenmerk hierbei auf der Kombination verschiedenartiger Therapieansätze.

1.2.1 Adoptiver T-Zelltransfer

T-Zell basierte Immuntherapien versuchen das Immunsystem des Patienten so zu modulieren, dass es die Tumorzellen besser bzw. effizienter erkennt und eliminiert. Dies ist prinzipiell dadurch möglich, dass Tumorzellen spezifische Proteine, sog. Tumorantigene, an ihrer Oberfläche exprimieren, die von Immunzellen als fremd erkannt werden. Allgemein werden bei der adoptiven T-Zelltherapie dem Patienten (autolog), oder nach einer Stammzellspende dem Spender (allogen), T-Zellen entnommen und *in vitro* diejenigen T-Zellen, welche sich gegen spezifische Antigene richten, selektioniert und expandiert. Anschließend werden die generierten spezifischen T-Zellen dem Tumorpatienten verabreicht (Kalos and June, 2013). Die Geschichte humaner adoptiver T-Zelltherapie beginnt 1991 in Seattle. Eine Gruppe Wissenschaftler expandierte *ex vivo* CMV-spezifische T-Zellen und infundierte diese Hochrisikopatienten (nach Knochenmark-Transplantation), wodurch *in vivo* eine Immunantwort zum Schutz vor der CMV-Erkrankung entstand (Greenberg et al., 1991). Zwei Arten von Effektorzellen wurden für den Einsatz im adaptiven T-Zelltransfer getestet, T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), da sie *ex vivo* relativ einfach isoliert und manipuliert werden können, und dazu in der Lage sind, zytotoxisch ihr Ziel zu erreichen (Ruella and Kalos, 2014). Der Einsatz von

autologen Tumor-infiltrierenden Lymphozyten führte zum Beispiel in der Studie von Rosenberg et al. zu einer vollständigen Regression des Tumors bei 22% der Patienten mit metastasiertem Melanom, unabhängig davon, welche Therapie sie im Vorfeld erhalten hatten. Insgesamt hatten 20% aller Patienten eine komplette Tumor-Regression über drei Jahre hinaus. Das 3- bzw. 5-Jahres-Überleben lag insgesamt bei 36% bzw. 29% und bei den Patienten mit kompletter Tumor-Regression sogar bei 100% bzw. 93% (Rosenberg et al., 2011).

In der Forschung wurde der Fokus des adoptiven T-Zelltransfers lange Zeit auf CD8⁺ T-Zellen gelegt. Der Grund hierfür ist, dass CD8⁺ T-Zellen über Antigen-präsentierende Zellen körperfremde Antigene mittels MHC-Klasse-I Moleküle erkennen, wohingegen CD4⁺ T-Zellen körperfremde Antigene mittels MHC-Klasse-II Moleküle, die nicht auf allen kernhaltigen Zellen vorkommen, erkennen. Die von einer CD8⁺ T-Zelle als fremd erkannte Zelle kann daraufhin mittels Sekretion von zytotoxischen Substanzen (Perforin und Granzyme) angegriffen und ihre Apoptose induziert werden. Neben virusinfizierten Zellen können so auch neoplastische Zellen erkannt werden, da theoretisch jede kernhaltige Zelle MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimiert (Restifo et al., 2012). Krebszellen regulieren die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen oft herunter (Restifo et al., 1993), so dass deren Erkennung erschwert ist. Hier kommt die sogenannte *cross-presentation* bzw. das *cross-priming* der Dendritischen Zellen (DCs) zum Einsatz. Wenn die nicht direkt infizierten DCs exogene Antigene von infektiösen oder neoplastischen Substanzen erkennen, können sie diese in Form von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren (Kurts et al., 2010). Hierfür sind bislang zwei Hauptmechanismen bekannt: Der zytosolische und der vakuoläre Weg. Bei diesen wird das Antigen im Zytosol bzw. im endozytotischen Raum verarbeitet und anschließend präsentiert (Joffre et al., 2012, Sanchez-Paulete et al., 2017). Durch diese Mechanismen werden die malignen Zellen, trotz verringerter MHC-I-Expression, durch das Immunsystem erkannt und können angegriffen werden.

CD4⁺ T-Zellen hingegen sind lange Zeit nicht wirklich berücksichtigt worden, obwohl in einer Studie von Kenneth Hung et al. nachgewiesen wurde, dass eine effektive anti-Tumor Immunität stark von CD4⁺ T-Zellen abhängig ist. CD4⁺ T-

Zellen wirken mittels ihrer T_H1 und T_H2 Zytokine auf diverse immunologische Bereiche ein (Hung et al., 1998). So kann zum Beispiel über die IFN- γ Sekretion der $CD4^+$ T-Zellen die Expression von MHC-Klasse-II-Antigenen hochreguliert werden (Steimle et al., 1994). Es konnte sogar nachgewiesen werden, dass $CD4^+$ T-Zellen Tumorzellen teilweise besser bekämpfen konnten als $CD8^+$ T-Zellen, obwohl die neoplastischen Zellen keine Expression von MHC-Klasse-II-Antigenen aufwiesen (Perez-Diez et al., 2007). Für den maximalen anti-Tumor-Effekt arbeiteten die $CD4^+$ T-Zellen eng mit NK-Zellen zusammen (Perez-Diez et al., 2007). Welche Rolle $CD4^+$ T-Zellen bei der Bekämpfung von Neoplasien einnehmen, ist von ihren Transkriptionsfaktoren abhängig, welche ihre Polarisation bestimmen (Nakayamada et al., 2012, Rosenberg and Restifo, 2015). So sind T_H1 Zellen zum Beispiel durch ihre sezernierten Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 befähigt $CD8^+$ T-Zellen zu aktivieren und Einfluss auf deren Entwicklung und Lebensdauer zu nehmen (Pardoll and Topalian, 1998, Antony et al., 2005, Knutson and Disis, 2005). Die Signalweiterleitung mittels der T_H1 Zytokine IFN- γ und des TNF Rezeptor 1 (TNFR1) besitzt noch weitere Funktionen, wie einen Anti-Tumor-Effekt, eine Anti-Angiogenese und eine verminderte Proliferation der Krebszellen (Muller-Hermelink et al., 2008, Wieder et al., 2008), oder die Aktivierung von APC und der direkte Untergang von Tumorzellen (Knutson and Disis, 2005). Es konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass Tumorantigen-spezifische $CD4^+$ T-Zellen mit einem T_H1 -Profil sowohl zur Induktion von Apoptose, wie auch zur Induktion von Seneszenz, einem Wachstumsstillstand, fähig sind (Kayser et al., 2015). Ein Wachstumsstillstand kann durch verschiedene Ursachen, wie zum Beispiel DNA-Schäden, Chromatin-Störungen, dysfunktionale Telomere, Onkogene oder Stress bedingt sein (Campisi, 2013, Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Zellen, welche in Seneszenz eintreten, haben einen sogenannten Seneszenz-Phänotyp, welcher folgende Eigenschaften beinhaltet: Verlust der Fähigkeit zur Proliferation, (meist) Unempfindlichkeit gegenüber Apoptose-Signalen und Veränderung der Gen-Expression (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Darüber hinaus haben seneszente Zellen auch einen Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP). Dieser befähigt die seneszenten Zellen zum

Beispiel zur Stimulation der Zellproliferation, der Angiogenese oder der Inflammation. Dies ist durch die Sekretion von Zytokinen (v.a. IL-6 und IL-8), Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Proteasen möglich (Krtolica et al., 2001, Coppe et al., 2008, Campisi, 2013). Die Sekretion dieser Botenstoffe kann, je nach Umfeld und Immunstatus der Mausmodelle, eine positive oder eine negative Wirkung auf die Proliferation von Neoplasien haben (Coppe et al., 2006). Man vermutet, dass Seneszenz in jungen Jahren die Entstehung von Krebs hemmt, wohingegen sie im Alter die Entstehung von altersbedingten Erkrankungen und Krebs begünstigt (Krtolica et al., 2001, de Magalhaes and Passos, 2018). Dessen ungeachtet konnte die Induktion permanenter Seneszenz in der G1/G0-Phase des Zellzyklus, in Abhängigkeit von IFN- γ und TNFR1, in Mäusen mit β -Zell-Tumoren nachgewiesen werden (Braumuller et al., 2013). Die Induktion von Seneszenz durch die Zytokine IFN- γ und TNF- α wurde für Brustkrebs im Mausmodell, wie für die humane Rhabdomyosarkomzelllinie A204 nachgewiesen (Braumuller et al., 2013). Folglich könnten CD4⁺ T-Zellen im adoptiven T-Zelltransfer nicht nur zur direkten Bekämpfung, sondern zusätzlich bei der Induktion von Seneszenz ein wichtiger Bestandteil der zukünftigen Krebstherapie sein. Das teilweise schlechte Ansprechen auf Immuntherapien, zum Beispiel aufgrund verminderte Tumorantigen-Expression (Restifo et al., 2012), könnte durch die Kombination mit anderen Therapien, wie dem Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren, vermindert werden.

1.2.2 Immun-Checkpoint Modulation

Das menschliche Immunsystem muss, neben den in 1.1 genannten schützenden Aufgaben auch die Funktion erfüllen, körpereigene Bestandteile als eigen zu erkennen und diese, im Gegensatz zu fremden Zellen, nicht anzugreifen. Um diesen Spagat zu meistern, verfügt das Immunsystem, im Falle von T-Zellen, unter anderem über aktivierende (stimulierende) und hemmende (inhibitorische) Signalwege. Diese inhibitorischen Signalwege, auch Immun-Checkpoints genannt, haben die Funktion, überschießende Reaktionen auf körpereigene Substanzen zu verhindern, da zum Beispiel ein Mangel an inhibitorischen Signalen zu Autoimmunerkrankungen oder Gewebeschädigung führen kann

(Pardoll, 2012). Die Aktivierung oder Inhibierung ist durch die Kopplung von Rezeptor und Ligand und daraus resultierenden Interaktionen möglich (Topalian, 2017). Als Therapieoption ist die Blockade von Immun-Checkpoints mittels Antikörper interessant, da neoplastische Zellen Liganden und/oder Rezeptoren von Immun-Checkpoints oft überexprimieren und somit der effektiven Vernichtung durch Immunzellen entgehen (Pardoll, 2012). Zusätzlich ist häufig die T-Zell-Antwort aufgrund erschöpfter T-Zellen vermindert, welche vermehrt in der Umgebung von Neoplasien vorkommen (Wherry and Kurachi, 2015). Erschöpfte T-Zellen weisen eine eingeschränkte Proliferationskapazität, eine abnehmende Sekretion von IL-2, ein verringertes zytotoxisches Potential und eine gedrosselte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen auf (Pauken and Wherry, 2015). Eine weitere Eigenschaft von erschöpften T-Zellen ist die erhöhte Expression von diversen Immun-Checkpoints wie *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA-4, CD152), *programmed death 1* (PD1, CD279), *lymphocyte activation gene 3* (LAG3, CD223) und *T-cell immunoglobulin-3* (TIM3). Eine erhöhte Expression der Immun-Checkpoints führt wiederum zu einer Abnahme der T-Zell-Funktion (Blackburn et al., 2009). Der erste entdeckte und charakterisierte Immun-Checkpoint war in den 1990er Jahren CTLA-4 (Leach et al., 1996, Topalian, 2017). Dieser Immun-Checkpoint vermindert, genauso wie LAG3 und TIM3, die T-Zell-Aktivierung durch Interaktion während deren Priming-Phase (Anderson et al., 2016). CTLA-4 und CD28 sind homologe Rezeptoren, welche auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen exprimiert werden. Die beiden Rezeptoren vermitteln entgegengesetzte Funktionen der T-Zell-Aktivierung und konkurrieren um die Liganden CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), welche auf Antigen-präsentierenden Zellen vorkommen. CTLA-4 inhibiert die T-Zell-Antwort, wohingegen CD28 die T-Zell Co-Stimulierung mit T-Zell-Rezeptor-Signalen vermittelt (Rowshanravan et al., 2018). Der Einsatz von CTLA-4 blockierenden Antikörpern führte in Tiermodellen und beim Menschen teilweise zu einer Tumorregression, so dass 2011 mit Ipilimumab (Yervoy®) der erste Immun-Checkpoint-Inhibitor für das metastasierte Melanom durch die FDA (*U. S. Food and Drug Administration*) zugelassen wurde (Leach et al., 1996, Schadendorf et al., 2015, Sharma and Allison, 2015, Topalian, 2017). Trotz dieser Fortschritte

treten bei ca. 60-65% der behandelten Patienten immunologische Nebenwirkungen wie Entzündungen zum Beispiel von Haut, Leber, Darm und Schilddrüse auf (Rowshanravan et al., 2018). Diese Ergebnisse beschleunigten die Forschung, so dass bald klinische Studien zur Blockierung von PD1 bzw. dessen Ligand *programmed death Ligand 1* (PD-L1, B7H1, CD274) durchgeführt wurden (Topalian, 2017). Dies war durch die Entdeckung der Liganden PD-L1 und PD-L2 (B7DC, CD273) um die Jahrtausendwende möglich, da dadurch die Funktion von PD1 als Immun-Checkpoint erkannt wurde (Freeman et al., 2000). Die Expression von PD1 ist unter anderem bei aktivierten T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) hochreguliert, so dass die Bindung an den passenden Liganden, PD-L1 bzw. PD-L2, zu einer Unterdrückung der aktivierten T-Zellen in der Effektorphase und zu verminderter Proliferation führt (Topalian et al., 2012a, Abril-Rodriguez and Ribas, 2017). PD-L1 und PD-L2 werden von einigen Zellen, einschließlich APCs (zum Beispiel DCs), T- und B-Zellen und Tumorzellen, exprimiert (Dyck and Mills, 2017). Die Effekte, welche durch die Bindung von PD1 an PD-L1 bzw. PD-L2 erzielt werden, hängen, soweit bislang *in vitro* erforscht und verstanden, von verschiedenen Faktoren ab: Zum einen von der Zelle, welche den Liganden exprimiert, und zum anderen von den Molekülen, welche die Signalweiterleitung der Rezeptor-Liganden-Bindung übernehmen (Dyck and Mills, 2017). Die Gabe des Immun-Checkpoint-Inhibitors Nivolumab (PD1-Inhibitor, Opdivo®) führte bei 20-25% der behandelten Patienten mit refraktärem Melanom, Nierenzellkarzinom und Nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) zu langandauerndem, objektiven Ansprechen. Von den Patienten mit PD1 positiven Tumoren sprachen 36% auf die Therapie mit Nivolumab an, wohingegen keiner der Patienten mit PD1 negativen Tumoren von der Therapie profitierte. Mit 14% Grad 3 bis Grad 4 Nebenwirkungen scheint es, als würde die Therapie mit Nivolumab besser als diejenige mit Ipilimumab vertragen zu werden. Das Nebenwirkungsprofil beinhaltet neben Fatigue, vermindertem Appetit, Diarrhoe, Nausea, Obstipation, Husten, Dyspnoe, Hautausschlägen, Fieber und Kopfschmerzen auch medikamenten-induzierte Nebenwirkungen wie Pneumonitis, Vitiligo, Kolitis, Hepatitis, Hypophysitis und Thyreoiditis (Topalian et al., 2012b). Aufgrund der verschiedenen Wirkungsweisen der blockierenden Antikörper von CTLA-4 und

PD1 wurde eine Kombinationstherapie der beiden zuerst im Mausmodell und anschließend in klinischen Studien getestet. Diese ergaben eine Tumorregression von ca. 50% bei Patienten mit fortgeschrittenem Melanom (Wolchok et al., 2013, Sharma and Allison, 2015). In einer Phase III Studie, in welcher die Behandlung von Ipilimumab mit der von Nivolumab und einer Kombinationstherapie aus beiden Antikörpern verglichen wurde, konnte festgestellt werden, dass die Kombinationstherapie sowie die alleinigen Therapie mit Ipilimumab zu einem Überlebensvorteil gegenüber Nivolumab führt (Hodi et al., 2018). Bis heute sind diverse Antikörper gegen Immun-Checkpoints (CTLA-4, PD1, PD-L1 und weitere) von der FDA zugelassen, unter anderem gegen das metastasierte Melanom, Lungenkrebs, Hodgkin Lymphome, Urothel-, hepatozelluläre, kolorektales und Magenkarzinom (Abril-Rodriguez and Ribas, 2017, Zhang et al., 2018).

In der Folge wurden weitere, vielversprechende Immun-Checkpoints der nächsten Generation, wie LAG3, TIM3 und B7-H3 (CD276) untersucht. LAG3, ein Molekül, welches von aktivierten B-, T- und NK-Zellen sowie DCs exprimiert wird (Topalian et al., 2015) und auf aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und einer Untergruppe von NK-Zellen hochreguliert ist (Triebel et al., 1990), wurde vor knapp 30 Jahren entdeckt. LAG3 ähnelt strukturell dem CD4-Corezeptor und bindet mit größerer Affinität an MHC-Klasse II (Anderson et al., 2016). Es konnte nachgewiesen werden, dass LAG3 die T-Zell-Expansion negativ beeinflusst, wie auch einen negativen Einfluss auf die Funktion von CD8⁺ und NK-Zellen hat (Zytokinproduktion, Calciumfluss). Da CD8⁺ T- und NK-Zellen nicht mit MHC-Klasse II interagieren wird das Vorliegen eines bisher unbekanntes Liganden für LAG3 diskutiert (Anderson et al., 2016). Des Weiteren wurde gezeigt, dass LAG3 zusammen mit PD1 unter anderem von CD4⁺ und CD8⁺ Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) im Mausmodell exprimiert wird und die Inhibierung beider Immun-Checkpoints zu einer verbesserten anti-Tumor CD8⁺ T-Zellantwort führt (Woo et al., 2012). Am Beispiel des Ovarialkarzinoms konnte daraufhin eine verbesserte Proliferation und Zytokinproduktion von Tumorantigen-spezifischen (NY-ESO-1 spezifischen) CD8⁺ T-Zellen durch die synchrone Blockierung von PD1 und LAG3 beobachtet werden (Matsuzaki et al., 2010).

Der Immun-Checkpoint TIM3 wurde vor über 15 Jahren entdeckt und wird neben IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Helfer-Zellen (T_H1) und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen auch auf T regulierenden Zellen, DCs, NK-Zellen und Monozyten exprimiert (Anderson et al., 2016). TIM3 ist bei chronischen Virusinfektionen und bei malignen Erkrankungen stark exprimiert und trägt zur Minderung der protektiven Immunität bei, da TIM3 einer der Hauptverantwortlichen für die Effektor-T-Zellfunktion ist (Anderson et al., 2016). Dies gelingt TIM3 über die Bindung an Liganden wie Galectin-9, Ceacam-1, Phosphatidyl Serine und High Mobility Group Protein B1 (Zhu et al., 2005, Cao et al., 2007, Santiago et al., 2007a, Santiago et al., 2007b, Chiba et al., 2012, Huang et al., 2015b, Anderson et al., 2016). CD8⁺ T-Zellen, welche TIM3 exprimieren, zeigen bei chronischen Virusinfektionen und Krebserkrankungen einen nicht funktionalen oder erschöpften Phänotyp (Anderson et al., 2016). Dies bedeutet, dass ihre Fähigkeit zur Proliferation und zur Sekretion von IFN- γ , IL-2 und TNF- α vermindert ist (Topalian et al., 2015). Häufig liegt neben der Expression von TIM3 eine gleichzeitige Expression von PD1 vor, weswegen in Studien ein verbessertes Ansprechen auf die duale Blockierung von PD1 und TIM3, verglichen mit der alleinigen Inhibierung von einem der beiden Immun-Checkpoints, erreicht werden konnte. Dies war neben dem fortgeschrittenen metastasierten Melanom auch beim NSCLC und beim follikulären B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom (FL) der Fall. Auch konnte eine positive Korrelation zwischen der Anzahl TIM3 positiver T-Zellen und der Schwere der Erkrankung bzw. schlechter Prognose für chronische Virusinfektionen und einige Krebserkrankungen, wie das NSCLC oder das FL, nachgewiesen werden (Fourcade et al., 2010, Gao et al., 2012, Yang et al., 2012, Anderson et al., 2016).

B7-H3 (CD276) gehört zur B7-Familie und ist ein Typ I Membranprotein, welches in vielen Geweben exprimiert wird (Chapoval et al., 2001, Sun et al., 2002). Die lösliche Form wird von der Oberfläche von Monozyten, DCs und aktivierten T-Zellen freigesetzt und zirkuliert im Serum bzw. Plasma (Zhang et al., 2008). B7-H3 hat verschiedene Wirkungsweisen. Es ist einerseits dazu in der Lage die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Populationen zu steigern und die IFN- γ Produktion zu stimulieren (Chapoval et al., 2001). Andererseits fungiert B7-H3,

wenn es auf Immunzellen vorkommt, als Co-Inhibitor, indem es die CD4⁺ T-Zell-Aktivität und die Produktion der Zytokine IFN- γ und IL-4 hemmt (Hofmeyer et al., 2008). Diese entgegengesetzte Wirkung könnte an der Bindung verschiedener Rezeptoren, je nach Zielzelle, liegen (Hofmeyer et al., 2008). Nichtsdestotrotz ist B7-H3 in vielen Neoplasien überexprimiert und mit einem schlechteren Überleben assoziiert (Topalian et al., 2015). So konnte nachgewiesen werden, dass die Höhe der B7-H3 Expression in Osteosarkomen mit dem Vorkommen von frühen pulmonalen Metastasen korreliert (Wang et al., 2013). Zusätzlich wurde herausgefunden, dass B7-H3 mit Proteinen assoziiert ist, welche zur Karzinommigration und -invasion, sowie zur Angiogenese beitragen (Castellanos et al., 2017). In den letzten Jahren wurden mehr Beweise für die inhibitorische Wirkung von B7-H3 erbracht, so dass diesem Molekül weiter Beachtung geschenkt und seine Rolle in der Tumorprogression und Therapie weiter untersucht werden sollte.

Zusätzlich konnte beim Kolonkarzinom nachgewiesen werden, dass beim Vorliegen von Mikrosatelliteninstabilität eine deutlich erhöhte Expression von CTLA-4, PD1 und LAG3 im Vergleich zu mikrosatellitenstabilen Tumoren vorliegt (Llosa et al., 2015). Dies wiederum erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass eine Therapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren erfolgreich sein kann. Doch trotz all dieser Erkenntnisse ist die Karzinomentstehung und deren Behandlung noch lange nicht vollständig verstanden, so dass es noch viel zu erforschen und verstehen gibt.

1.2.3 Tumorantigene und deren epigenetische Modulation

Tumorantigene sind Antigene, welche von malignen Zellen gebildet und entweder auf deren Oberfläche exprimiert werden oder im extrazellulären Raum vorliegen und bei mit Malignomen befallenen Lebewesen eine Immunantwort auslösen können (Steinman, 1991, Meeusen et al., 2017). Die Tumorantigene können auf zwei Arten unterteilt werden: Erstens in Tumor-spezifische (TSA) und Tumor-assoziierte Antigene (TAA). TSA werden nur von malignen Zellen exprimiert, wodurch sie vom Immunsystem erkannt und angegriffen werden können. TAA hingegen werden auch von gesunden Gewebearten exprimiert,

weswegen ihre Antigenität von der Expressionsstärke und der immunologischen Toleranz abhängig ist. Außerdem haben TAA, aufgrund ihres Vorkommens auf gesunden Geweben, eine geringere Affinität zu T-Zell-Rezeptoren als TSA (Novellino et al., 2005, Gubin et al., 2015). Zweitens können die Tumorantigene auch anhand ihres Expressionsmusters in fünf verschiedene Klassen unterteilt werden: Mutations- (Neo-), Differenzierungs-, überexprimierte, Cancer-Testis- (CTA) und onkovirale Antigene (Novellino et al., 2005, White et al., 2014). Zu den TSA zählen neben den Mutations- auch die onkoviralen Antigene. Mutationsantigene, wie zum Beispiel β -Catenin, welches in Melanomen vorkommt, entstehen durch diverse tumorspezifische somatische Mutationen und werden daher als strikt Tumor-spezifische Antigene angesehen, wodurch sie für Immuntherapien sehr attraktiv sind (Robbins et al., 1996, Novellino et al., 2005, Lucas and Coulie, 2008, Gubin et al., 2015, Hutchison and Pritchard, 2018). Onkovirale Antigene, wie zum Beispiel die Humanen Papillomavirus-Typen 16 und 18 (HPV 16 und 18), führen durch eine chronische Infektion zu Veränderungen im Genom, wodurch sie die Entstehung von Karzinomen initiieren und fördern können. Im Falle von HPV 16 und 18 kann eine chronische Infektion neben dem Zervixkarzinom (Gebärmutterhalskrebs) auch zum Vulva-, Vaginal-, Anal-, Penis- oder Oropharynxkarzinom führen (White et al., 2014). Differenzierungsantigene kommen in Neoplasien, sowie dem Ursprungsgewebe, von welchem der Tumor abstammt, vor. Ein Beispiel hierfür ist das bekannte Prostata-spezifische Antigen (PSA) (Novellino et al., 2005). Bei den überexprimierten Antigenen handelt es sich um Antigene, welche in diversen Tumorentitäten und im gesunden Gewebe exprimiert werden, aber nicht gewebespezifisch sind. Im gesunden Gewebe scheint die Expressionsrate zu niedrig zu sein, um eine Immunantwort auszulösen. Durch die Hochregulation in malignem Gewebe wird jedoch eine Immunantwort ausgelöst. Zu den überexprimierten Antigenen zählt beispielsweise das HER-2/neu Antigen, welches bei gesunden Menschen von Epithelzellen exprimiert wird, und im Falle von Brustkrebs, Melanomen, Ovarial-, Magen- oder Pankreaskarzinomen überexprimiert sein kann (Novellino et al., 2005, Lucas and Coulie, 2008). Die Klasse der Cancer-Testis-Antigene hat ihren Namen aufgrund ihres

Vorkommens erhalten. Sie werden neben einer Vielzahl maligner Tumore auch von Keimbahnzellen (Hoden, Plazenta und fetalen Eierstöcken) exprimiert. Hier ist ihr Vorkommen auf Spermato gonien, Oogonien und plazentare Zellen (Trophoblasten) beschränkt (Hutchison and Pritchard, 2018). Aufgrund des Fehlens von HLA-Klasse I oder II Molekülen und der damit einhergehenden fehlenden Immunogenität stellt die Expression auf Keimbahnzellen für mögliche Therapieansätze nur ein geringes Risiko dar. Einige CTA werden aber zum Beispiel auch von Pankreas-, Leber- und Milzzellen exprimiert, jedoch in weitaus geringeren Mengen (kleiner 1% verglichen mit der Expression in Keimbahnzellen oder malignen Tumoren) (Zendman et al., 2003, Scanlan et al., 2004). Antigene werden als CTA geführt, wenn sie, abgesehen von Tumoren und Keimbahnzellen, in maximal zwei normalen Gewebearten exprimiert werden. CTA können in Antigene, welche auf dem X-Chromosom kodiert sind und solche, die nicht auf dem X-Chromosom kodiert sind, unterteilt werden. Die X-chromosomalen CTA sind meist in Familien, welche dieselben invertierten DNA-Repeats aufweisen, organisiert. Beispiele hierfür sind die MAGE-, GAGE- und NY-ESO-1-Familien. Das als erstes entdeckte CTA, MAGE-A1, gehört zur Familie der X-chromosomalen CTA und wurde 1991 von Wissenschaftlern um van der Bruggen in verschiedenen Melanomzelllinien nachgewiesen (van der Bruggen et al., 1991). Die CTA hingegen, welche nicht auf dem X-Chromosom kodieren, sind über das gesamte Autosom verteilt und nicht in Familien organisiert (Simpson et al., 2005, Fratta et al., 2011). Weitere Charakteristika der CTA sind ihre Immunogenität und dass ihre Expression von epigenetischen Mechanismen reguliert wird (Zendman et al., 2003, Scanlan et al., 2004, Lim et al., 2005, Costa et al., 2007).

1.2.3.1 Die Tumorantigene MAGE-A3, PRAME und ROR1

MAGE-A3, PRAME und ROR1 zählen zu den Tumor-assoziierten Antigenen. MAGE-A3 und PRAME sind Cancer-Testis-Antigene, wohingegen ROR1 ein überexprimiertes Antigen darstellt.

MAGE-A3

Die MAGE-Familie (*Melanoma-associated antigens*) gehört zu den X-chromosomalen Cancer-Testis-Antigenen (Xq24-q28) und wird durch eine zentrale Region, die *MAGE homologe domain* (MHD) charakterisiert. Es gibt mehr als 60 Gene in menschlichen Wesen, die der MAGE-Superfamilie angehören, wovon eine MAGE-A3 ist. Die MAGE-Superfamilie kann, aufgrund der Lokalisation und ihrer Proteinverteilung, in MAGE-I und MAGE-II Proteine unterteilt werden, wovon die MAGE-I Proteine zu den CTA gehören. MAGE-Gene kodieren für multifunktionale Regulatormoleküle, welche eine Vielzahl von Funktionen ausüben. Normalerweise werden MAGE-I Proteine als CTA nur auf Neoplasien und Keimbahnzellen exprimiert, es konnte jedoch eine kurzzeitige Expression von MAGE während der embryonalen Entwicklung von Hirnstamm und Rückenmark nachgewiesen werden. Allgemein tendieren MAGE-Gene auf Neoplasien häufig zur Co-Expression von mehreren MAGE-Genen oder einem MAGE-Gen und anderen Antigenen. Ferner korreliert ihr Auftreten mit einer schlechteren Prognose. Darüber hinaus sind MAGE-A Proteine dazu in der Lage p53 vermittelte Transkriptionen zu unterdrücken und dadurch die p53 vermittelte Apoptose und Seneszenz zu inhibieren (Zendman et al., 2003, Simpson et al., 2005, Fratta et al., 2011, Meek and Marcar, 2012, Coulie et al., 2014, Gjerstorff et al., 2008). MAGE-A3 im speziellen wird stark auf Melanomen, NSCLC, Blasen-, squamösen Ösophagus- und Hepatozellulären Karzinomen exprimiert (Gaugler et al., 1994, Chen et al., 1999, Scanlan et al., 2000, Van Der Bruggen et al., 2002, Weinert et al., 2009, Fratta et al., 2011). Eine Besonderheit von MAGE-A3 ist die Expression, neben genannten Tumoren und Keimbahnzellen, auf bestimmten somatischen Geweben wie der Prostata und der Schilddrüse (Meek and Marcar, 2012). In normalem Schilddrüsengewebe kann MAGE-A3 über einen speziellen Signalweg (FGFR2-IIIb = *fibroblast growth factor receptor 2 - IIIb*) Einfluss auf das Zellwachstum nehmen (Kondo et al., 2007, Zhu et al., 2008). Allgemein wird eine MAGE-A3 Expression mit einer Steigerung des Zellzyklus, erhöhter Migration und Invasion von Zellen der Schilddrüse *in vitro* in Verbindung gebracht (Liu et al., 2008). Eine weitere Besonderheit von MAGE-A1, 2 und 3 ist die relative Resistenz gegenüber TNF- α induzierter Zytotoxizität (Park et al., 2002).

Außerdem werden MAGE-A3 überexprimierende Malignome mit einer Doxorubicin-Resistenz assoziiert (Bertram et al., 1998).

PRAME

Das *Preferentially expressed antigen of melanoma*, kurz PRAME, wird bei gesunden Menschen vorwiegend im Hoden und minimal in Endometrium, Gehirn, Haut, Nebennieren und Ovarien exprimiert (Hermes et al., 2016). Beim Auftreten von Leukämien, Lungenkrebs, Melanomen, Nierenzellkrebs und Sarkomen kann die Expression von PRAME hochreguliert sein (Novellino et al., 2005). Das Besondere an PRAME im Vergleich zu den meisten anderen Cancer-Testis-Antigenen ist, dass es neben soliden Tumoren auch von hämatopoetischen Tumorzellen exprimiert wird (Qin et al., 2017). Neben der Mitwirkung von PRAME in der Signal-Weiterleitung und vielen weiteren Prozessen, ist die Expression von PRAME in Kombination mit klinischen Parametern auch als prognostischer und prädiktiver Marker für zum Beispiel Brustkrebs hilfreich (Sun et al., 2010).

ROR1

Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) ist ein Tumorantigen, von dem es drei verschiedene Varianten gibt: Ein Transmembranprotein, welches auf der Zelloberfläche exprimiert wird, eine intrazelluläre Variante und eine intrazelluläre wie sekretorische Variante (Dave et al., 2012, Rebagay et al., 2012, Balakrishnan et al., 2017). Normalerweise wirkt ROR1 bei der Organogenese von Skelett- und Neuralgewebe, Lunge und Herz mit, weswegen dessen Expression während der fetalen Entwicklung abnimmt und seine Expression somit in den meisten Geweben vernachlässigbar gering ist (Green et al., 2014, Hojjat-Farsangi et al., 2014, Hasan et al., 2019). ROR1 wird trotz allem, neben vielen Tumorentitäten (triple negativem Brustkrebs, Ovarial-, Adenokarzinom der Lunge, Sarkomen, Pankreaskarzinom, Akute und Chronisch Lymphatische Leukämie (ALL und CLL), Mantelzelllymphom) auch, entgegen mancher Annahmen, auf der Oberfläche von vielen normalen Gewebearten wie Zellen der Nebenschilddrüsen, Pankreasinseln, Ösophagus, Magen, Duodenum, Fettgewebe und hämatologischen Zellen exprimiert (Fukuda et al., 2008, Huang et al., 2015a, Balakrishnan et al., 2017, Karvonen et al., 2018). ROR1 interagiert in diversen Signalwegen und verstärkt zum Beispiel über eine extrazelluläre Wnt-

Bindungsstelle die gerichtete Migration und Polarität von Zellen (Witze et al., 2008). Dass es über die Bindung an Wnt5a zu einer Aktivierung von ROR1 kommt, wurde bereits früher für solide Tumoren, wie zum Beispiel Ewing Sarkome und die CLL, nachgewiesen (Fukuda et al., 2008, Hojjat-Farsangi et al., 2014, Potratz et al., 2016). Hasan et al. konnten später den genauen Ablauf des Wnt5a-Signalweges über eine ROR1-abhängige Phosphorylierung und Aktivierung von Cortacin nachweisen. Cortacin ist ein zytoplasmatisches Protein, welches durch Phosphorylierung und Expression mit einer erhöhten Migration von Zellen der CLL einhergeht. Dies führt wiederum zu einer Aktivierung vom ARHGEF1-Gen, welches für ein Protein kodiert, dass Rho-abhängige Signalwege stimuliert. RhoA wirkt unter anderem bei der Zellteilung mit. Derzeit finden klinische Studien mit einem anti-ROR1 monoklonalen Antikörper (Cirmtuzumab) in CLL-Patienten statt. Dieser kann die Aktivierung der ROR1-abhängige Signalwege über Cortacin, ARHGEF1 und RhoA und die damit verbundenen Wachstums-, Überlebens- und Migrations-Signalwege inhibieren (Hasan et al., 2019). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der ROR1-Expression und der STAT3-Aktivierung bei der CLL und der B-ALL vorliegt. STAT3 gehört zur Gruppe der STAT-Transkriptionsfaktoren, welche am Zellwachstum, der Zellproliferation und dem Immunsystem beteiligt sind (Li et al., 2010, Bicocca et al., 2012, Karvonen et al., 2018). Diese Erkenntnisse ermöglichen neue Ansätze medikamentöser Therapien von Malignomen, welche ROR1 in hohem Maße exprimieren. Die Kombinationstherapie mit Cirmtuzumab und Ibrutinib (Inhibitor von kleinen Molekülen, von denen B-Zell-Malignome meist abhängig sind) bei Lymphatischen Leukämien und Mantelzell-Lymphomen erscheint vielversprechend, da sie im Mausmodell bereits bessere Ergebnisse als Monotherapien bei der Bekämpfung von leukämischen Zellen gezeigt haben (Karvonen et al., 2018).

1.2.3.2 Die epigenetische Modulation von Cancer-Testis-Antigenen

Die Epigenetik beschreibt ein Gebiet der Biologie, welches sich mit der Veränderung des Phänotyps, nicht jedoch des Genotyps, befasst. Diese

Veränderungen spielen bei der Embryogenese, dem *Imprinting* (Prägung), der X-chromosomalen Inaktivierung und beim Zustand vieler Erkrankungen, wie zum Beispiel Krebs, eine wichtige Rolle (Taby and Issa, 2010). Es wurde herausgefunden, dass neben genetischen Mutationen, Translokationen und ähnlichen, auch epigenetische Dysregulationen an der Entstehung von Krebs beteiligt sind (Vogelstein and Kinzler, 2004, Feinberg et al., 2016). Es gibt diverse epigenetische Mechanismen, sogenannte kovalente Modifikationen von DNA oder Histonen, wie beispielsweise die DNA-Methylierung und Histon-Acetylierung oder -Methylierung (Kim and Yeom, 2018, Mohammad et al., 2019). Eingeteilt werden die epigenetischen Veränderungen in drei Hauptgruppen: Die epigenetischen Modulatoren, Mediatoren und Modifikatoren (Feinberg et al., 2016). Die DNA-Methylierung zählt zu den Modifikatoren und ist unter den epigenetischen Mechanismen vermutlich der wichtigste. Soweit heute bekannt, ist eine DNA-Methylierung nur bei den Basen Adenin und Cytosin möglich. Eine Methylierung von Adenin in Säugetieren konnte bisher nicht nachgewiesen werden, weswegen davon ausgegangen wird, dass beim Menschen nur

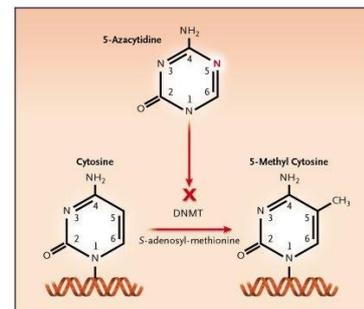


Abbildung 1: Methylierung von Cytosin (Herman and Baylin, 2003).

eine Methylierung von Cytosin vorkommt (Ratel et al., 2006). Eine Methylierung von Cytosin wurde ferner nur bei CpG-Dinukleotiden bzw. CpG-Inseln nachgewiesen. CpG-Dinukleotide sind Dinukleotide der DNA, welche in 5'-3' Richtung ein Cytosin bzw. Guanin enthalten, welche über eine Phosphorsäure direkt miteinander verbunden sind (Jones et al., 2019). CpG-Inseln sind Sequenzen der DNA, die eine hohe Dichte an CpG-Dinukleotiden aufweisen. Außerdem konnte ein vermehrtes Auftreten (bei ca. 50% der Gene) dieser CpG-Inseln distal von Promotorregionen festgestellt werden (Illingworth and Bird, 2009). CpG-Inseln sind in Keimbahnzellen und Promotoren von somatischen Zellen unmethyliert, so dass dort Gene exprimiert werden können (Baylin, 2005). Bei der DNA-Methylierung bindet die Methylgruppe vom Donor S-Adenosyl-Methionin an den fünften Kohlenstoff des Cytosin-Ringes. Als Katalysator für diese Reaktion fungieren DNA-Methyltransferasen (DNMTs), welche in der S-

Phase des Zellzyklus vorliegen (siehe Abbildung 1) (Herman and Baylin, 2003, Taby and Issa, 2010). Die DNA-Methylierung von Gen-Promotor CpG-Inseln kann mit der Inaktivierung bzw. Stilllegung der Expression von Genen wie zum Beispiel dem zweiten X-Chromosom bei Frauen in Verbindung gebracht werden (Klose and Bird, 2006). DNA-Methylierung kann, über die Inaktivierung von DNA-Reparatur-Genen, zur Mikrosatelliteninstabilität und somit höheren Mutationsraten führen. Eine gesteigerte spontane Desaminierung und Bindung von Karzinogenen an die DNA, sowie erhöhte UV-Absorption der DNA können ebenfalls vorkommen und die Mutationsraten steigern bzw. Gene inaktivieren (Baylin, 2005). Maligne Tumoren bedienen sich zum Beispiel der epigenetischen DNA-Methylierung, um die Funktion von Tumor-Suppressor-Genen oder regulierenden Proteinen direkt oder indirekt zu inaktivieren. Diese spielen beim Zellwachstum, der Zelldifferenzierung, der Signaltransduktion und der DNA-Reparatur eine Rolle und nehmen auf die Angiogenese oder Metastasierung von Malignomen Einfluss (Jones and Baylin, 2002, Baylin, 2005). Zusätzlich wird die Expression von CTA durch die DNA-Methylierung ihres Promotors sowie post-translationale Modifikationen kontrolliert (Fratta et al., 2011). Viele maligne Tumoren sind dazu in der Lage ihre Immunogenität herabzusetzen, indem sie zum Beispiel die Expression von Tumorantigenen (durch Methylierung), MHC-I- oder MHC-II-Molekülen herunter regulieren, ihre eigenen Antigene neutralisieren oder eine immunsuppressive Umgebung schaffen (Wolf and Rotter, 1985, Ploegh, 1998, Ayyoub et al., 2001). Dadurch werden Krebszellen teilweise nicht oder schlecht von Immunzellen erkannt und bekämpft. Eine Möglichkeit die DNA-Methylierung zu verhindern und somit die CTA-Expression aufrecht zu erhalten bzw. wieder zu erhöhen, sind DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMT-Inhibitoren), da CTA durch Demethylierung ihres Promotors aktiviert werden (Sigalotti et al., 2005, Coulie et al., 2014). DNMT-Inhibitoren verhindern die DNA-Methylierung des Cytosins und somit erfolgt die Expression der CTA. Zu diesen DNMT-Inhibitoren zählen die Agenzien Azacitidine (*5-azacytidine*) und Decitabine (*5-aza-2'-deoxycitidine*) (Bao et al., 2011, Mohammad et al., 2019). Decitabine bindet mit einer höheren Spezifität als Azacitidine an DNA. Trotz allem müssen beide Agenzien durch kovalente Bindung in RNA bzw. DNA eingebaut

werden, um eine Inhibierung der DNMT zu erreichen. Dies bedingt eine mehrtägige Einnahme, um Effekte zu erzielen. Ferner ist eine regelmäßige, andauernde Einnahme nötig, da es ansonsten, nach dem Abbau der in wässriger Lösung instabilen Agenzien, erneut zu einer Promotormethylierung und somit Geninaktivierung kommen würde. Mit der Entwicklung stabiler DNMT-Inhibitoren, wie zum Beispiel Zebularine, wurden neue Therapieprotokolle erstellt, welche derzeit in klinischen Studien getestet werden (Mai and Altucci, 2009). Es wurden, durch unspezifische Inhibierung der DNMTs, teilweise systemische toxische Effekte, wie eine Myelosuppression, induziert (Herman and Baylin, 2003), welche durch die Gabe von niedrigeren Dosen stark verringert werden konnten. So liegen bereits gute Ergebnisse für die Behandlung von Patienten mit DNMT-Inhibitoren bei hämatopoetischen Malignomen (Myelodysplastischem Syndrom, Akute Myeloische Leukämie) vor (Dawson and Kouzarides, 2012, Ruter et al., 2004). Daraus resultierend haben Azacitidine und Decitabine die Zulassung der FDA, der Health Canada und der European Medicines Agency (EMA) für das Myelodysplastische Syndrom erhalten (Jones et al., 2019). Auch haben DNMT-Inhibitoren noch weitere Effekte: Sie wirken nicht nur auf Tumorzellen, sondern auch auf Immunzellen. Dies hat eine gesteigerte Anti-Tumor-Immunität, Prävention der T-Zell-Erschöpfung, erhöhte Tumor-Infiltration von Immunzellen und allgemein eine gesteigerte Funktion von Immunzellen zur Folge (Saleh et al., 2016, Mohammad et al., 2019). Eine Behandlung mit Decitabine über fünf Tage führte bei Patienten mit soliden Tumoren zu einer Hochregulation von zum Beispiel MAGE-A3 in Ewing, Osteo- und Rhabdomyosarkomen und zu einer verbesserten Erkennung der Tumorzellen durch antigenspezifische zytotoxische T-Zellen (Krishnadas et al., 2014). Da DNMT-Inhibitoren neben einer Hochregulierung oder *de novo* Expression von CTA auch zu einer erhöhten Expression von PD1 und PD-L1 führen, ist anzunehmen, dass T-Zellen frühzeitig erschöpft sein würden und dadurch die Wirkung der DNMT-Inhibitoren abgeschwächt werden würde. Daher könnte die simultane Therapie von DNMT-Inhibitoren und Checkpoint-Inhibitoren zu einer effizienteren Behandlung führen (Mohammad et al., 2019).

1.3 Sarkome

Sarkome sind eine heterogene Gruppe von malignen Tumoren mesenchymalen Ursprungs mit mehr als 50 histologischen Subtypen (D'Angelo, 2016). Sie machen ca. 1% aller adulten und ca. 20% aller soliden pädiatrischen Krebsarten aus (Burningham et al., 2012). Pädiatrische Sarkome können angeboren sein, treten jedoch meist in der Kindheit auf und sind im Gegensatz zu adulten Sarkomen relativ sensitiv gegenüber Chemo- und Radiotherapie (Wolden and Alektiar, 2010). Anders ist es bei metastasierten Sarkomen. Diese sind im Allgemeinen nicht sensitiv gegenüber standardisierten Chemo- oder Radiotherapieprotokollen, was mit einem mittleren Überleben von nur etwa einem Jahr einhergeht (Veenstra et al., 2018). Um diese Prognose zu verbessern, werden derzeit verschiedene klinischen Studien zu Immuntherapien mit zum Beispiel blockierenden Antikörpern durchgeführt. Daher gilt es weiterhin zu untersuchen, welche Mechanismen Einfluss auf das Überleben der Patienten haben und welche Therapien dadurch möglich und effizient sind.

1.3.1 Ewing Sarkome

Ewing Sarkome wurden als erstes von James Ewing 1921 als diffuse Endotheliome beschrieben, da er die Zellen der Knochenmalignome keiner anderen, bis dahin bekannten, Knochenkrebsart zuordnen konnte (Ewing, 1972). Sie machen ca. 10-15% aller malignen Knochtumore und 40-45% der pädiatrischen malignen Knochtumore aus, wodurch sie die zweithäufigste malignen Knochtumorart bei Kindern, vor allem Jungen, sind (Kridis et al., 2017). Interessanterweise finden sich kaum EWS in Kindern und Jugendlichen afrikanischer, afroamerikanischer oder ostasiatischer Abstammung (Parkin et al., 1993). EWS treten vor allem zwischen dem zehnten und 20. Lebensjahr (fünftes bis 30. Lebensjahr) auf und können am ganzen Skelett, sowie der quergestreiften Muskulatur vorkommen (Wolden and Alektiar, 2010). Prädilektionsstellen sind Diaphysen langer Röhrenknochen, platte Knochen oder Rippen. Wenn das EWS metastasiert, sind Metastasen meist in der Lunge oder der Wirbelsäule bzw. dem Rückenmark zu finden. Unterteilt werden können die hochmalignen EWS in typische, atypische und primitive neuroektodermale Tumoren (PNET). EWS

zeigen bei einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung folgende histologisch Charakteristika: Kleine, blau angefärbte Tumorzellen, mit perfekten runden Zellkernen mit feinem Chromatin und glatten Konturen. Die Zellgrenzen sind ungenau bestimmt, mit wenig Zytoplasma, welches eher hell als eosinophil erscheint. PNET zeigen histologisch ein gleiches Bild, jedoch bilden sie rosettenförmige Tumorzellanordnungen, die sog. Homer-Wright-Rosetten (Antonescu, 2014). In 85-95% der Fälle weisen EWS die Translokation EWSR1-FLI1 [t(11;22)(q24;q12)] auf (Downing et al., 1993, Delattre et al., 1994, Sreekantaiah et al., 1994). Weitere 5-10% der EWS weisen die Translokation EWSR1-ERG [t(21;22)(q22;q12)] auf (Ginsberg et al., 1999). Beide Translokationen initiieren mutmaßlich onkogene Ereignisse und scheinen eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Tumorentstehung zu spielen (Arvand and Denny, 2001). Es sind noch weitere Translokationen und eine Inversion entdeckt worden, doch treten diese selten auf (Kilpatrick et al., 2018). Klinisch klagten Patienten mit EWS anfangs eher über diffuse, teilweise belastungsabhängige oder nächtliche Schmerzen, welche meist mit einer lokalisierten Schwellung einhergehen. Bei einer metastasierten Erkrankung können, in Abhängigkeit der Lokalisation und Ausbreitung, B-Symptomatik, pathologische Frakturen oder neurologische Beschwerden hinzukommen. Zur Diagnosefindung werden bildgebende Verfahren wie Röntgen-, MRT- oder CT - Untersuchungen eingesetzt. Gestellt werden kann die Diagnose des Subtyps jedoch nur mit einem pathologischen Nachweis mittels Biopsie (Frank et al., 2017). Nachdem die Art des Ewing Sarkoms diagnostiziert wurde, wird die passende Therapie, in der Regel bestehend aus neoadjuvanter Chemotherapie und lokaler chirurgischer Resektion, plus ggf., bei nicht vollständig resezierten Tumoren, Radiotherapie eingeleitet. Ein gängiges Chemotherapieschema beinhaltet folgende Therapeutika: Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Ifosfamid und Etoposid. Ein verbessertes Ergebnis in Hinblick auf das tumorfreie Überleben konnte durch eine Intensivierung der Dosis, zum Beispiel durch Verkürzung der Pausen zwischen den Chemotherapiezyklen von drei auf zwei Wochen, erreicht werden. Während keine erhöhte Toxizität messbar war, konnte das tumorfreie Überleben von Patienten mit lokalisiertem Malignom nach im

Mittel fünf Jahren von 65% auf 73% angehoben werden (Womer et al., 2012). Patienten, welche bei der Diagnosestellung bereits eine Lungenmetastase aufweisen, haben ein Langzeitüberleben von ca. 30-50% und Patienten mit Metastasen in entfernten Knochen von weniger als 20% (Grier et al., 2003). Weniger als 5% der Patienten, die nach einer Therapie ein Rezidiv bekommen, überleben hingegen zwei oder mehr Jahre (Meyers, 2015). In einer klinischen Phase III Studie der *European Ewing tumor Working Initiative of National Groups* (EE99) konnte das beste 5-Jahres-Überleben mit 78,2% bei Patienten mit lokalen EWS und geringem Risiko bei einer Therapie mit sechs Zyklen Vincristin, Actinomycin D und Cyclophosphamid erzielt werden (Frank et al., 2017). Diese Zahlen animieren Forscher weitere Anstrengungen zu unternehmen, um Therapien mit besseren Heilungschancen, insbesondere bei metastasierten Sarkomen, zu entwickeln.

1.3.2 Osteosarkome

Das Osteosarkom ist im Kindes- und Jugendalter der häufigste primäre maligne Knochentumor und die dritthäufigste maligne Erkrankung nach Lymphomen und Hirntumoren. Das Auftreten von Osteosarkomen hat zwei Peaks, im Kindes- und Jugendalter zwischen zehn und 20 Jahren und bei Erwachsenen über 65 Jahren. Mädchen erkranken meist früher als Jungen. Sie sind bei der Diagnose im Schnitt zwischen zehn und 14 Jahre alt, wohingegen Jungen, die allgemein etwas häufiger als Mädchen betroffen sind, erst zwischen 15 und 19 Jahren erkranken. Im Alter ist das Verhältnis zwischen Männern und Frauen ausgeglichen (Simpson and Brown, 2018). Im Kindes- und Jugendalter erkranken eher Menschen asiatischer Abstammung, im Alter hingegen mehr Menschen afrikanischer oder afroamerikanischer Abstammung, sowie Kaukasier (Mirabello et al., 2009a).

Die Pathomechanismen zur Entstehung von Osteosarkomen sind bisher nicht vollständig entschlüsselt, es konnten aber Risikofaktoren wie vorausgegangene Bestrahlung, Chemotherapie, Morbus Paget bzw. allgemein benigne Knochenerkrankungen und hereditäre Erkrankungen gefunden werden. Man geht zudem davon aus, dass ein schnelles Knochenwachstum mit der Erkrankung assoziiert ist, hat hierfür aber bisher keinen Beweis erbringen

können. Ein Zusammenhang zwischen Mutationen im RB- bzw. p53-Gen werden ebenfalls vermutet, konnten aber ebenso wenig definitiv bestätigt werden (Luetke et al., 2014).

Histopathologisch können Osteosarkome in drei Gruppen eingeteilt werden: hoch-, intermediär- und niedrigmaligne Osteosarkome. Hochmaligne Osteosarkome werden in das konventionelle Osteosarkom, das hochmaligne Oberflächenosteosarkom, kleinzellige, teleangiektatische und das sekundäre Osteosarkom unterteilt. Hiervon machen 80-90% das konventionelle Osteosarkom aus, welches chondro-, osteo- oder fibroblastisch imponiert. Das intermediärmaligne Sarkom wird auch als periostales Osteosarkom bezeichnet. Niedrigmaligne Osteosarkome unterteilen sich in das zentrale und parossale Osteosarkom, wobei das parossale Osteosarkom als einziges Osteosarkom primär kein infiltratives Wachstum aufweist.

Klinisch sind Osteosarkome anfangs schwer von normalen Sporttraumen zu unterscheiden, da an der betroffenen Stelle oft ein Minortrauma, wie zum Beispiel ein Schlag gegen das Schienbein, vorausgegangen ist. Daraufhin sind Rötung, Überwärmung und Schwellung vorhanden und das Kind bzw. der oder die Jugendliche klagt über Schmerzen und der Bewegungsumfang ist eingeschränkt. Zusätzlich ist hier oft eine kleine Masse palpierbar. Die Schmerzstärke variiert, jedoch verschwinden die Schmerzen nie ganz und sind oftmals nachts ausgeprägt. Prädilektionsstellen des Osteosarkoms sind die Metaphysen langer Röhrenknochen, wie des distalen Femurs, der proximalen Tibia oder des proximalen Humerus. Einige wenige Patienten weisen eine B-Symptomatik auf. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung dauern die Schmerzen bereits oft über drei Monate an und 20% der Patienten haben bereits Metastasen. Diese kommen bevorzugt im selben Knochen als sogenannte *skip lesions*, sowie in anderen Knochen, der Lunge und Lymphknoten vor und sind häufig mit einer Lymphadenopathie assoziiert. Da viele Patienten, bei denen keine Metastasen bei Diagnosestellung vorliegen, im Verlauf, trotz lokaler Tumorkontrolle, Metastasen entwickeln, wird davon ausgegangen, dass bei Diagnosestellung bereits häufig, in etwa 80% der Fälle, Mikrometastasen vorliegen. Aus diesem Grund wird selbst in diesem Fall eine ganzheitliche Therapie angestrebt

(Simpson and Brown, 2018). Um die Diagnose Osteosarkom zu stellen, sollte bei einem Verdacht zuerst ein Röntgenbild in zwei Ebenen angefertigt werden. Auf diesen Bildern können osteosklerotische Veränderungen, sowie allgemeine Zeichen von Knochendestruktion und zerstörter Kortikalis, wie zum Beispiel ein Codman-Dreieck, Osteolysen und Spiculae, gesehen werden. Zudem ist teilweise das Periost zwiebelschalenförmig abgehoben oder es sind parossal wolkenartige Verkalkungen zu sehen. Es können aber auch, trotz des Vorliegens eines Osteosarkoms, keinerlei radiologische Zeichen sichtbar sein. Daher sollten zusätzlich, zur genaueren Beurteilung und zum Ausschluss von Metastasen, sowie ggf. zur OP-Planung, eine MRT, eine CT vom Thorax oder eine Ganzkörper-CT, sowie eine Skelett-Szintigraphie durchgeführt werden. Anstatt der Skelett-Szintigraphie oder in Ergänzung zu dieser wird seit einigen Jahren auch eine PET vorgenommen. In der laborchemischen Untersuchung sollten, neben einem Standardlabor bei Verdacht auf einen Tumor, welche die LDH, Calcium und Phosphat beinhaltet, auch eine ALP sowie ein ACP bestimmt werden. Da die Höhe der ALP und des ACP von Alter, Geschlecht und auch Pubertätsstand abhängig ist, wird seit einiger Zeit der Verhältniswert der ALP zur ACP zur Diagnostik und Prognose eingesetzt, da dieser der alleinigen Bestimmung der ALP überlegen ist. Die definitive Diagnose kann aber nur mittels einer Biopsie gestellt werden (Shimose et al., 2014, Simpson and Brown, 2018). Sobald die Diagnose eines Osteosarkoms gestellt wurde, wird im Normalfall innerhalb von vier Wochen mit einer neoadjuvante Chemotherapie begonnen. Durch dieses therapeutische Vorgehen konnte die Heilungsrate für nicht sichtbar metastasierte Osteosarkompatienten von 20% auf 60-70% gesteigert werden (Link et al., 1986, Smeland et al., 2019). Die Chemotherapie besteht in der Regel aus einer Dreifachkombination der Chemotherapeutika: Cisplatin, Doxorubicin, Ifosfamid und hochdosiertem Methotrexat. Jegliche Dreifachkombination der vier Substanzen ist einer Therapie mit nur einem oder zwei Chemotherapeutika überlegen und eine Systemtherapie mit allen vier Medikamenten hat kein verbessertes Überleben im Vergleich zur Dreifachtherapie gezeigt (Anninga et al., 2011). Seit der EURAMOS-1 (*European and American Osteosarcoma Study*), bei welcher von 2005 bis 2011 die Daten von über 2000 Patienten unter 40

Jahren mit hochmalignen Osteosarkomen ausgewertet wurden, gilt die zehnwöchige Dreifachkombination aus Cisplatin, Doxorubicin und hochdosiertem Methotrexat als Standardsystemtherapie für Patienten unter 40 Jahren (Smeland et al., 2019). Bisher liegt kein Nachweis vor, dass Patienten über 40 Jahren einen Vorteil durch den Einsatz von hochdosiertem Methotrexat haben, so dass bei älteren Patienten nur eine Zweifachtherapie mit Cisplatin und Doxorubicin angewendet wird. Dies ist aber umstritten, da Zweifachtherapien Dreifachtherapien unterlegen sind (Anninga et al., 2011). Die neoadjuvante Chemotherapie führt zu einer Nekrose im Inneren des Tumors und anschließend wird eine, wenn möglich extremitätenerhaltende, Operation durchgeführt. Extremitätenerhaltende Operationen führen, trotz R0-Resektionen, im Vergleich zu Amputationen, häufiger zu lokalisierten Rezidiven. Auf das Überleben haben die verschiedenen Operationstechniken aber keinen signifikanten Einfluss (Luetke et al., 2014). Nach einer etwa dreiwöchigen Heilungsphase nach der Operation, wird eine adjuvante Chemotherapie für weitere zwölf bis 29 Wochen durchgeführt. Zur Chemotherapie können Bisphosphonate gegeben werden. Sie verbessern die Wirkung der Chemotherapie nicht, sollen aber für eine verbesserte Erhaltung von Extremitätenrekonstruktionen mitverantwortlich sein (Meyers et al., 2011, Piperno-Neumann et al., 2016). Zur Verbesserung der Wirkung der Systemtherapie wurden Studien, welche zusätzlich Mifamurtid einsetzen, durchgeführt. Mifamurtid ist ein liposomales Muramylpeptid, welches Monozyten und Makrophagen aktiviert, aber keinen Einfluss auf die verabreichten Chemotherapeutika hat. In Studien konnten statistisch signifikante Verbesserungen im Überleben bei zusätzlicher Gabe von Mifamurtid nachgewiesen werden. Außerdem liegt bei der Einnahme von Mifamurtid ein Trend zum längeren ereignisfreien Überleben vor (Meyers et al., 2008, Anderson et al., 2014).

Neben der klassischen Behandlung mit Chemotherapeutika und anschließender Operation werden zunehmend andere Therapeutika, wie zum Beispiel der humane monoklonale IgG2-Antikörper Denosumab oder der Proteinkinaseinhibitor Sorafenib in Einzelheilversuchen und Studien getestet, da die Überlebenschancen von älteren Patienten, sowie von Patienten mit einem

metastasierten Osteosarkom oder einem Rezidiv deutlich unter denen junger Patienten mit der Erstdiagnose eines Osteosarkoms liegen. Patienten, die zum Zeitpunkt der Diagnose über 40 Jahre alt sind, haben, je nach Veröffentlichung, nur ein 5-Jahres-Überleben von 18-55%, wobei das 5-Jahres-Überleben mit dem Alter stark sinkt und bei Patienten Ende sechzig in den USA nur noch bei ca. 17% liegt. Im Gegensatz dazu haben Patienten unter 25 Jahren ein 5-Jahres-Überleben von 61,6% ± 15%. Etwa 20% der Patienten haben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits Metastasen, so dass ihre Wahrscheinlichkeit die nächsten fünf Jahre nicht zu sterben nur noch bei 20-30% liegt. Rezidive treten bei ca. 30-40% der Patienten auf und haben mit einem 5-Jahres Überleben von 23-29% eine ebenso schlechte Prognose wie Patienten mit einem metastasierten Osteosarkom (Mirabello et al., 2009a, Mirabello et al., 2009b, Allison et al., 2012, Luetke et al., 2014).

Sorafenib induziert zum Beispiel in vielen Krebsarten durch Herabregulierung des anti-apoptischen Proteins MCL-1 die Apoptose und ist bereits für bestimmte Patientengruppen mit Nieren-, Leber- (HCC) oder Schilddrüsenkrebs zugelassen. Da 84% der untersuchten Osteosarkomzelllinien eine erhöhte Expression von MCL-1 aufweisen, wurden Phase I und Phase II Studien mit Sorafenib und mit Sorafenib in Kombination mit zum Beispiel Everolimus bei chemotherapierefraktären und nicht operablen Osteosarkompatienten durchgeführt. Diese Studien zeigten nur bei manchen Patienten ein kurzweiliges Ansprechen, so dass keine Phase III Studien durchgeführt wurden (Kansara et al., 2014, Coventon, 2017).

Neben dem Ziel, die Erkrankung früh zu erkennen, gilt es, die Entstehung von Osteosarkomen vollständig zu verstehen und weitere Therapieansätze zu entwickeln, um ein besseres Überleben erzielen zu können.

1.3.3 Immuntherapien und demethylierende Agenzien bei Sarkomen

Aufgrund der anhaltend schlechten Prognose von Kindern und Jugendlichen mit metastasierten oder rezidivierenden Sarkomen, wurde nach alternativen Therapien bzw. Therapieansätzen geforscht. So konnte eine Gruppe Wissenschaftler um Melinda S. Merchant durch die Gabe einer Immuntherapie

(antineoplastische Standardtherapie plus Gabe von autologen Lymphozyten, mit Tumorlysat oder Hämözyanin gepulsten DCs mit oder ohne die Gabe von rekombinanten humanen IL-7) ein 5-Jahres-Überleben bei Patienten mit neu diagnostizierten, metastasierten Ewing oder Rhabdomyosarkomen von 77% erreichen. Dies war ohne Grad 3 oder 4 unerwünschte Nebenwirkungen durch die Gabe von autologen Lymphozyten oder gepulsten DCs möglich. Auf das rekombinante humane IL-7 konnten bei 7% der Patienten Nebenwirkungen des Grades 3 und in zwei Fällen Nebenwirkungen des Grades 4 zurückgeführt werden. Es konnte auch beobachtet werden, dass selbst Patienten, welche ein Rezidiv hatten, mit der Gabe der Immuntherapie ein längeres Überleben aufwiesen. Außerdem wurde ein besseres Resultat erzielt, wenn Patienten eine messbare T-Zell-Antwort generierten (Merchant et al., 2016a). Die Ergebnisse sind in der Forschung jedoch umstritten. Forscher konnten einen Zusammenhang zwischen Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) und der Expression von PD-L1 zeigen, und dass, wenn PD-L1 bei zum Beispiel Ewing Sarkomen (EWS) exprimiert wurde, mehr TIL gefunden und das Gesamtüberleben verbessert wurde (Berghuis et al., 2011). Bei Osteosarkomen hingegen wurden zwar ebenfalls mehr TIL in der Umgebung von PD-L1-exprimierenden Tumoren gefunden, jedoch wurde hier eine Assoziation zwischen vermindertem 5-Jahres-Überleben und PD-L1-Expression erkannt (Koirala et al., 2016). Eine Gruppe um Sandra P. D'Angelo fand zudem heraus, dass bei Weichteilsarkomen die Expression von PD-L1 eher selten ist und dass es keine Assoziation zwischen der Expression von PD-L1, TIL und dem Langzeitüberleben von Patienten mit Sarkomen gibt (D'Angelo et al., 2015). Da hier verschiedene Studienergebnisse vorliegen, müssen weitere Studien und deren Ergebnisse abgewartet werden, um endgültige Aussagen bezüglich des Überlebens, TIL und der PD-L1 / PD1 Expression treffen zu können. Gleichzeitig wurden Studien durchgeführt, welche sich mit der Behandlung solider Tumoren im Kindes- und Jugendalter mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren befassten. Der Einsatz des Checkpoint-Inhibitors Ipilimumab wurde zwar meist gut toleriert, brachte aber nicht die erhofften Ergebnisse (Merchant et al., 2016b, D'Angelo et al., 2017). Auch der Einsatz von Pembrolizumab brachte nicht den erhofften

Durchbruch in der Behandlung von Knochensarkomen. So sprach in einer Phase II Studie keiner von 13 Ewing Sarkom Patienten auf die Behandlung mit Pembrolizumab an. Es zeigte sich lediglich in 15% ein Wachstumsstillstand, wohingegen bei 85% ein Fortschreiten der Erkrankung zu verzeichnen war. Einer von 22 Osteosarkom Patienten (5%) zeigte einen Rückgang der Tumormasse, 27% eine stabile Erkrankung und bei 68% der Patienten schritt das Malignom voran (Tawbi et al., 2017). Derzeit sind viele Phase I und Phase II Studien mit Sarkompatienten im Gange, in welchen die Wirkung von blockierenden Antikörpern von CTLA-4, PD1, PD-L1 oder deren Kombination getestet werden. Die Hoffnung ist, dass die Ergebnisse der Studien mehr Klarheit bezüglich der Wirksamkeit von Immun-Checkpoint-Inhibitoren schaffen werden (Nathenson et al., 2018). Es könnte sein, dass Kinder und Jugendliche mit Sarkomen, welche Mikrosatelliteninstabilitäten aufweisen, von der Behandlung mit Checkpoint-Inhibitoren profitieren, da hierzu gute Ergebnisse bei Erwachsenen erzielt worden sind (Le et al., 2017). Neben Ansätzen mit zum Beispiel monoklonalen Antikörpern gegen CD276 (B7-H3), Immunzytokinen, chimären Antigen-Rezeptor T-Zellen und adoptiven T-Zelltransfer, wurden und werden auch Studien durchgeführt (Roberts et al., 2015), die sich mit der *de novo* Expression bzw. Hochregulation von Tumorantigenen befassen. Mit Azactidine bzw. Decitabine wurden gute Ergebnisse in hämatologischen Erkrankungen, im Vergleich zu konventionellen Therapieregimen, erzielt (Kantarjian et al., 2007, Fenaux et al., 2009). Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Behandlung mit Decitabine zu einer Hochregulation der mRNA Expression der Tumor-Antigene MAGE-A1, MAGE-A3 und NY-ESO-1 in sieben (MAGE) bzw. acht von zehn Sarkomzelllinien geführt hatte (Krishnadas et al., 2014). Dies sind vielversprechende Ergebnisse und Ansatzpunkte für Therapien, welche die Prognose von Patienten mit soliden Tumoren, wie Sarkomen, in Zukunft hoffentlich verbessern.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, die Expression der Cancer-Testis-Antigene (CTA) MAGE-A1, MAGE-A3, NY-ESO-1 und PRAME der Ewing Sarkome A673 und RDES, sowie der Osteosarkome SaOS und U2OS zu untersuchen. Außerdem soll die Expression der CTA mittels der epigenetischen demethylierenden Agens Decitabine moduliert, und die Veränderung der Expression ermittelt werden. Im nächsten Schritt sollen von gesunden Spendern Tumorantigen-spezifische IFN- γ^+ CD4 $^+$ T-Zellen magnetisch angereichert, isoliert und expandiert werden. Diese T-Zellen sollen daraufhin auf ihren Phänotyp, sowie ihre Funktionalität in Bezug auf ihre zytotoxische und Proliferationsfähigkeit untersucht werden. Ferner soll die Wirkung der selektionierten und expandierten T-Zellen auf Tumorzelllinien *in vitro* analysiert werden. Des Weiteren sollen sowohl T-Zellen, als auch Krebszellen mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren vorbehandelt werden um zu analysieren, ob dies zu einer effizienteren und langanhaltenderen T-Zellantwort gegenüber den Tumorzellen führt.

2 Material und Methoden

Nachdem die allgemeinen Zellkulturmethoden mit den entsprechenden Reagenzien erläutert werden, wird auf spezifischere in der Dissertation ebenfalls verwendete Analyseverfahren und dabei verwendete Reagenzien eingegangen.

2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

2.1.1 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wurden etwa 10µl der Zellsuspension mit 10µl 0,4%ige Trypanblau-Lösung (Sigma) vermischt und ein Teil davon in die Neubauer-Zählkammer pipettiert, in welcher die Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt wurden.

Zytosolische Proteine toter Zellen wurden durch den anionischen Diazofarbstoff Trypanblau, der in Zellen mit geschädigter Membran eindringt, blau gefärbt.

Vitale Zellen wurden nicht angefärbt und leuchteten somit hell.

Folgende Formel wurde für die Berechnung der Zellzahl verwendet:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor (Trypanblau)} \times \text{Volumen der Suspension in ml}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadranten}} \times 10.000$$

Für die Berechnung der Vitalität wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{vitale Zellen}}{\left[\frac{\text{vitale Zellen} + \text{tote Zellen}}{100} \right]}$$

2.1.2 Kryokonservierung von T-Zellen und Dendritischen Zellen

Nach der Zellzählung und der Berechnung des benötigten Einfriermediums (90% inaktiviertes FCS (gibco® by life technologies™), 10% CryoSure-DMSO (WAK – Chemie Medical GmbH)), wurde dieses frisch hergestellt. CryoSure-DMSO, ein Sulfoxid, hat als Gefrierschutz die Aufgabe beim Einfrieren die Bildung von Eiskristallen zu verhindern, da diese die Zellen zerstören würden. Die Zellmenge betrug 2x10⁷ Zellen/ml oder bis zu 5x10⁷ Zellen/2ml Einfriermedium. Das inaktivierte FCS wurde mit der benötigten Menge CryoSure-DMSO vermischt und kalt (4°C) gestellt.

Nach der Zentrifugation der Zellsuspension in einem Falcon (RT, 300g, 10 Minuten) wurde der Zellüberstand aus dem Falcon abpipettiert und das Zellpellet in ausgerechneter Menge Einfriermedium resuspendiert und auf die Kryotubes verteilt. Die Kryotubes wurden in einen *Freezing Container* (Kühlrate $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$), welcher mit Isopropanol gefüllt war, überführt und dieser über Nacht in einen Gefrierschrank (-80°C) gestellt. Am nächsten Tag wurden die Kryovials zur Langzeitlagerung in den Stickstofftank überführt.

2.1.3 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen wurden die kryokonservierten Zellen im warmen Wasserbad (37°C) erwärmt, bis nur noch ein Eiskristall im Aliquot vorhanden war. Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit kaltem Zellkulturmedium gewaschen (RT, 350g, 7 Minuten), bevor sie in warmes Zellkulturmedium mit Pulmozyme® (2.500E/2,5ml; Roche; $3\ \mu\text{g}/\text{ml}$; Ausnahme: DCs, diese benötigen kein Pulmozyme®) aufgenommen wurden. Pulmozyme® enthält das künstlich hergestellte Enzym Dornase alfa (= rekombinante humane Desoxyribonuklease I). Dieses Enzym ist in der Lage DNA, welche von zugrunde gehenden Zellen freigesetzt wird, zu spalten.

Die Zellsuspension wurde, je nach Zelltyp, zur Regeneration in den Brutschrank gestellt (T-Zellen) oder gleich für Versuche eingesetzt (DCs). Hierfür wurden die Zellen mit warmem Medium, welches für den Versuch nötig war, gewaschen (RT, 300g, 10 Minuten) und anschließend darin auf die benötigte Zellzahl eingestellt.

2.1.4 Bestrahlen von Zellen

Ionisierende Strahlung verändert die Erbsubstanz der bestrahlten Zellen derart, dass keine Zellteilung mehr stattfinden kann. Somit können die Bestandteile der bestrahlten Zellen als Nahrung für die Positive Fraktion (CD4^+ $\text{IFN-}\gamma^+$ T-Zellen) genutzt werden. Zur Bestrahlung wurde die Negative Fraktion und, wenn diese nicht ausreichend war, zusätzlich frische PBMCs desselben Spenders, verwendet und mit 30 Grey bestrahlt.

2.1.5 Gewinnung von Zellkulturüberständen

Zellkulturüberstände der generierten spezifischen T-Zellen wurden hergestellt, um mit ihnen einen Zytokin-induzierten (INF- γ und TNF) Wachstumsstillstand in Tumorzelllinien hervorzurufen (BrdU-Assay). Zur Gewinnung der Überstände wurden die spezifischen T-Zellen im Medium der Tumorzelllinie, welche untersucht werden sollte, auf 5×10^6 Zellen/ml und die DCs des T-Zell-Spenders auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Die spezifischen T-Zellen ($2,5 \times 10^6$) wurden mit DCs ($2,5 \times 10^5$) und dem entsprechenden Tumorantigen (20 μ l/ml) bzw. MOG (20 μ l/ml) restimuliert. Daraufhin wurden die Zellen für vier Stunden im Brutschrank inkubiert, so dass die Zytokine in den Überstand abgegeben werden konnten. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert (RT, 450g, 5min), der Überstand in Eppendorf Cups pipettiert und erneut zentrifugiert (4°C, 1000g, 15min). Abschließend wurde der erneute Überstand in kleine Eppendorf Cups überführt und direkt verwendet oder bei -80°C eingefroren.

2.1.6 Kultur und Splitting der adhärennten Tumorzelllinien

Alle benutzten Tumorzelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert. Als Medium wurden für die Ewing Sarkome DMEM GlutaMAX™-I Medium (gibco® by life technologies™) und für die Osteosarkome DMEM GlutaMAX™ F12 Medium (gibco® by life technologies™) verwendet. Beiden Medien wurde 10% hitze-inaktiviertes FCS (gibco® by life technologies™) und 1% Antibiotika (Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml/10.000 μ g/ml) von Biochrom GmbH) zugegeben. Die Melanomzelllinie WM115 wurde in zwei unterschiedlichen Medien, abhängig vom Folgeversuch, kultiviert. Zum einen wurde die Zelllinie WM115 mit RPMI-1640 Flüssigmedium mit stabilem Glutamin (2,0g/l NaHCO₃ und low endotoxine von Biochrom GmbH, F1215) und Zugabe von 1% Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml / 10.000 μ g/ml von Biochrom GmbH), sowie 20% hitze-inaktivierten FCS kultiviert. Zum anderen wurde die Zelllinie WM115 mit dem gleichen Medium, aber einem anderen Zusatz kultiviert. Anstatt 20% hitze-inaktivierten FCS wurden 10% gepooltes AB-Serum des Zentrums für klinische Transfusionsmedizin Tübingen (ZKT) zugegeben.

Die adhärennten Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 80-90% gesplittet. Zuerst wurde das Medium verworfen, die Zellkulturflasche mit PBS gewaschen und Trypsin-EDTA (0,05% von Biochrom GmbH) in die Zellkulturflasche gegeben, um die Zellen enzymatisch vom Boden der ZKF abzulösen. Sobald sich die Zellen vom Boden der ZKF gelöst hatten, wurde, um die Reaktion zu unterbrechen, Medium in die ZKF gegeben und die Zellen resuspendiert und ein Teil der Zellsuspension, abhängig vom Splitterverhältnis, in eine neue ZKF mit frischem Medium überführt.

2.2 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Messungen dienen der Ermittlung von verschiedenen chemischen und physikalischen Zelleigenschaften auf Einzelzellebene. Die Zellen werden hierfür mit speziellen Farbstoffen, sogenannten Fluoreszenzfarbstoffen, gefärbt und anschließend gemessen. Für die Messung werden die Zellen mit Überdruck angesaugt und stark beschleunigt, so dass sich die Aggregate auflösen. Daraufhin kann der jeweilige Detektor, abhängig vom Farbfilter, das Streulicht, welches beim Passieren der einzelnen Zelle des Lasers entsteht, messen. Beeinflusst wird die Lichtstreuung durch die Zellgröße (forward scatter = FSC = Vorwärtsstreulicht) und die intrazelluläre Granularität (side scatter = SSC = Seitwärtsstreulicht). Durch die Menge und die Art des gemessenen Streulichts können Rückschlüsse auf die Granularität und Größe und somit die Zellart gezogen werden. Für eine immunologische Phänotypisierung der Zellen können diese mit monoklonalen Antikörpern, welche mit einem Fluorochrom gekoppelt sind, inkubiert werden, so dass das entsprechende Antigen indirekt nachgewiesen werden kann. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zu der Anzahl an Antikörpern, die auf der Zelloberfläche gebunden haben. Da die meisten Zellen eine Autofluoreszenz aufweisen, muss eine Isotypenkontrolle (Zellkontrolle) mitgeführt werden, so dass festgelegt werden kann, ab welcher Fluoreszenzintensität eine Zelle als positiv für ein Antigen zu werten ist.

Die Messungen wurden am BD™ LSR II (BD Bioscience, Software: BD FACSDiva) durchgeführt, außer zweier Messungen während der Generierung

der spezifischen T-Zellen. Hierbei wurden die Zellen zunächst nach der siebentägigen Präsensibilisierung (CSA) und in einem zweiten Schritt nach der Anreicherung am BD FACSCalibur™ (BD Bioscience, Software: Cell Quest Pro) gemessen.

Am BD™ LSR II wurden DCs, die Zellen des BrdU-Assays und der B7H3-Färbung nach Standardlaserkonfiguration (siehe Abbildung 2) gemessen. Bei manchen Assays wurden Veränderungen der Standardlaserkonfiguration (nach standardisiertem Protokoll des Labors) vorgenommen (siehe Tabelle 1).

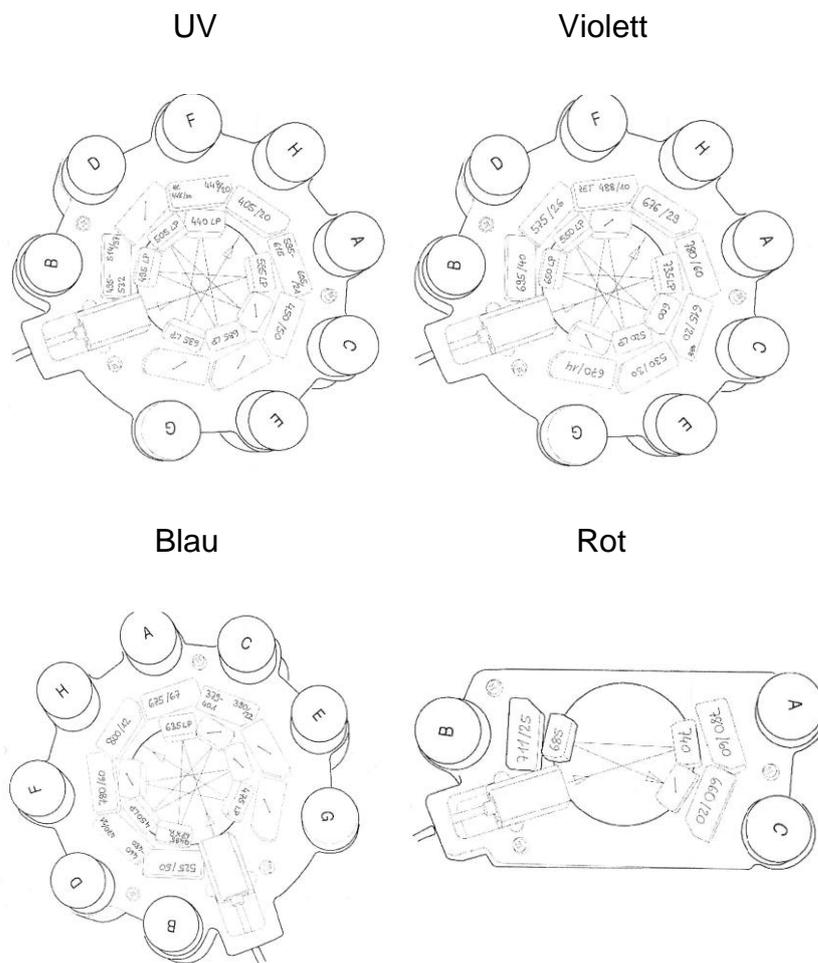


Abbildung 2: Standardkonfiguration LSR II (BD)

Assay	Laser	Position
CD107a / CFSE / Immunmonitoring	Violetter	Position C: 427/14
	UV	Position B: 448/20 und LP440
Subphänotypisierung der generierten T-Zellen	Violetter	Position A: 785 und LP750
		Position B: 595/605 und LP595 Position C: 427/14
	UV	Position C: 448/20 und LP440

Tabelle 1: Veränderung der Standardlaserkonfiguration des BD™ LSR II bei speziellen Assays

2.2.1 Kompensation mit Beads (BD™ LSR II)

Bei einer durchflusszytometrischen Messung mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen kann es, da die meisten Farbstoffe nicht exakt eine Farbe ausstrahlen, zur Detektion von Signalen in mehreren Kanälen kommen. Aus diesem Grund muss, um die Ergebnisse richtig interpretieren zu können, vor der eigentlichen Messung eine Kompensation mit Einzelfarbstoffmessungen durchgeführt werden. Hierbei wird die Streuung jeden Farbstoffes in andere Kanäle gemessen und rechnerisch korrigiert.

Für die Kompensationen wurden für alle Farbstoffe, außer für die Lebend-Tot-Färbung, das *AbC™ Anti-Mouse Bead Kit* (Invitrogen™ – Thermo Fisher Scientific) verwendet. Für die Kompensation der Lebend-Tot-Färbung wurde das *ArC™ Amine Reactive Compensation Bead Kit (for use with LIVE/DEAD™ Fixable dead cell stain kits)* von Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific) benutzt. Es wurden für jeden Farbstoff 25µl der positiven AbC-Beads in ein FACS-Röhrchen vorgelegt, sowie einmal 25µl der negative AbC-Beads und je einmal 25µl der positiven und negativen ArC-Beads für den Lebend-Tot-Farbstoff. Diese wurden dann mit je 1µl des entsprechenden Farbstoffes (mit Ausnahme der negativen Beads) vermengt und im Dunkeln inkubiert (RT, 10 Minuten). Die negativen Beads dienen als negative Kontrollen, weswegen ihnen kein Farbstoff zugegeben wurde. Anschließend wurden die Beads mit MACS-Puffer (PBS/EDTA Puffer, Miltenyi) gewaschen (RT, 450g, 5 Minuten), der Überstand verworfen und die Beads mit dem Rücklauf vermengt. Daraufhin wurden die Beads zur Kompensation verwendet. Anders hingegen wurde beim CFSE-Assay verfahren. Bei diesem dienten CFSE-ungefärbte Zellen als negative und CFSE-gefärbte Zellen als positive Kontrolle.

Die für die durchflusszytometrischen Analysen verwendeten Fluorochrom-markierten Antikörper sind in Tabelle 2 und in Tabelle 3 aufgeführt. Für die Lebend-Tot-Färbung wurden die Amin-reaktiven Farbstoffe Alexa Fluor™ 350 NHS Ester (Succinimidyl Ester) von Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific) oder Zombie Aqua (Biozol) verwendet.

Antikörper	Markierung	Klon	Hersteller
B7H3	PE	FM276	Miltenyi (#130-095-525)
CD107a	APC	H4A3	BD Bioscience (#560664)
CD154	PE	TRAP1	BD Bioscience (#557299)
CD27	PE-CF594	MT271	BD Bioscience (#562297)
CD28	PE-Cy7	CD28.2	eBioscience (#25-0289-42)
CD3	APC	SK7	BD Bioscience (#345767)
CD3	BV510	OKT3	BioLegend (#317332)
CD45RO	BV785	UCHL1	BioLegend (#304233)
CD4	AF700	MEM-241	ExBio (#A7-359-T100)
CD4	FITC	SK3	BD Bioscience (#345768)
CD56	BUV395	NCAM16.2	BD Bioscience (#563554)
CD56	BV605	HCD56	BD BioLegend (#318334)
CD62L	FITC	SK11	BD Bioscience (#347443)
CD80	PE	L307.4	BD Bioscience (#340294)
CD83	FITC	HB15e	BD Bioscience (#556910)
CD8	APC-H7	SK1	BD Bioscience (#560179)
Granzyme B	FITC	GB11	BD Bioscience (#558132)
IFN- γ	PE	25723.11	BD Bioscience (#340452)
IFN- γ	PE-Cy7	4S.B3	BD BioLegend (#502528)
IL-2	APC	MQ1-17H12	BioLegend (#500310)
LAG-3	PerCP-efluor 710	3DS223H	eBioscience (#46-2239-42)
PD-1	BV421	EH12.2H7	BioLegend (#329920)
PD-L1	APC	29E.2A3	BioLegend (#329708)
TIM-3	BV605	F38-2E2	BioLegend (#345017)
TNF	APC	Mab11	eBioscience (#17-7349-41)
TNF	BV421	Mab11	BioLegend (#502932)
TNF	FITC	Mab11	BioLegend (#502906)

Tabelle 2: Fluorochrom-markierte anti-humane Antikörper

Antikörper	Markierung	Klon	Hersteller
Mouse IgG ₁	APC	X40	BD Bioscience (#345818)
Mouse-IgG ₁	FITC	X40	BD Bioscience (#345815)
Mouse IgG ₁	PE	X40	BD Bioscience (#345816)
Simultest IgG ₁ /IgG _{2a}	IgG ₁ : FITC IgG _{2a} : PE	IgG ₁ : X40 IgG _{2a} : X39	BD Bioscience (#342409)

Tabelle 3: Fluorochrom-markierte Antikörper für Isotypenkontrollen

2.2.2 Analyse der durchflusszytometrischen Daten und deren Gating Hierarchie
Die ermittelten Daten wurden mit Hilfe des Programms FlowJo (Version 10) ausgewertet. Hierbei wurden alle Daten, die von intrazellulären Färbungen von T-Zellen erhoben wurden, nach einem einheitlichen Schema (siehe Abbildung 3) gegatet.



Abbildung 3: Standard Gating Hierarchie

Für das weitere Auswerten wurden die CD4⁺ und die CD8⁺ T-Zellen stets gleich, allerdings abhängig vom Versuch, gegatet¹. Beim Immunmonitoring wurden die CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation und elftägiger bzw. dreizehntägiger *in vitro* Kultivierung auf ihre Aktivität (CD154, IFN- γ , TNF- α und IL-2) sowie Immun-Checkpoints (B7-H3, LAG3, PD1 und TIM3) analysiert. Bei der Subphänotypisierung wurden sie hingegen auf IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen, TNF- α ⁺ CD4⁺ T-Zellen und dem Zytokinprofil untersucht. Zur Detektion des zytotoxischen Potentials wurden die TA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zum einen auf ihre Aktivität und Zytotoxizität und zum anderen auf ihre Aktivität und Immun-Checkpoints gegatet. Für die Ermittlung der Fähigkeit der Proliferation mussten die TA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen hingegen auf ihre Aktivität und Proliferation, ihre Proliferation mit Immun-Checkpoints, sowie ihr Zytokinprofil untersucht werden. Abweichend vom Standardschema (siehe Abbildung 3) wurden die DCs und die Zellzyklusanalyse (BrdU) gegatet. Bei den DCs wurde die Lebend-Tot-Fraktion direkt in DCs und T-Zellen unterteilt und beim BrdU-Assay wurde direkt nach der FSC/SSC-Analyse eine Aufteilung in folgende Phasen vorgenommen: G1/G0-Phase, S-Phase, G2/M-Phase und in apoptotische Zellen.

2.3 Analyse der Tumorzelllinien

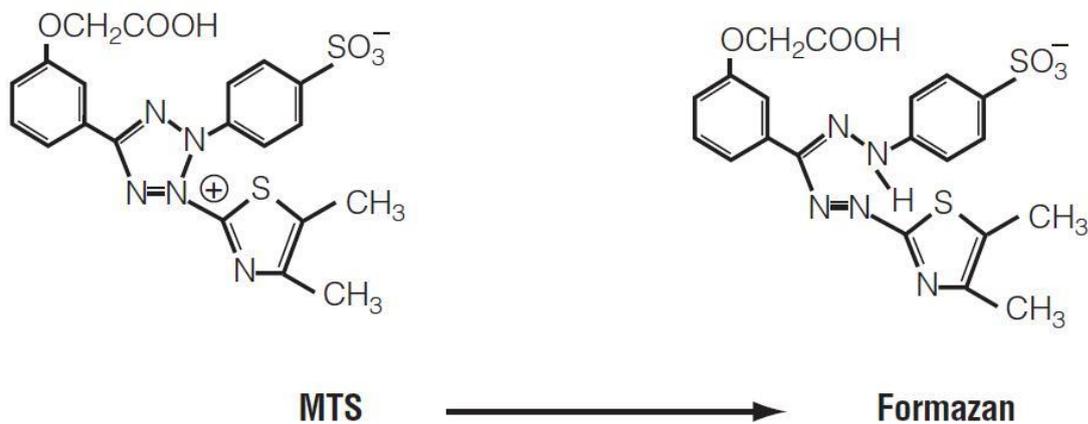
2.3.1 Viabilitäts Assay (MTS)

Das hierfür verwendete Reagenz *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* von Promega enthält das gelbliche Tetrazoliumsalz [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-

¹ Im weiteren Verlauf werden nur noch CD4⁺ T-Zellen, stellvertretend für beide Zellarten, genannt.

tetrazolium, inner salt; MTS] und PES, ein Elektronenbindungsgemisch. Mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen metabolisieren MTS zu violetter Formazan (siehe Abbildung 4).

Die an einem 96-Well-Plate-Reader bei einer Wellenlänge von 490nm (Referenzwellenlänge: 630nm) gemessene optische Dichte entspricht der Menge des umgesetzten Formazans und ist direkt proportional zur Viabilität der Zellen.



1605MB09_0A

Abbildung 4: Umwandlung von MTS in Formazan (Reduktion mittels NADH/NADPH)

Zu Beginn musste die optimale Zellzahl sowie der ideale Messzeitpunkt für den eigentlichen MTS-Assay ermittelt werden. Hierfür wurden die Zellen in verschiedenen Konzentrationen auf einer 96-Well Platte mit F-Bottom ausgesät. Zusätzlich wurde eine Mediumkontrolle mitgeführt. Die Wellplatte wurde für genau 96 Stunden in den Brutschrank gestellt, bevor sie unter dem Mikroskop zur Beurteilung der Konfluenz begutachtet wurde (Ziel: etwa 80-90%). Nun wurden pro Well 20µl MTS-Reagenz hinzugegeben. Nach Zugabe des MTS wurde die Wellplatte stündlich (Stunde eins bis vier) bei einer Wellenlänge von 490nm (und der Referenzwellenlänge 630nm) gemessen. Es ist von einer optimalen Zellzahl auszugehen, wenn die Optische Dichte (OD), nach Abzug der Referenzwellenlänge und des Mittelwertes der Mediumkontrolle, bei einer Konfluenz von 80-90% etwa 1 beträgt. Dabei sollte der Maximalwert der OD ohne Abzug der Referenzwellenlänge und der Mediumkontrolle nicht unter 0,5 und nicht über 1,8 liegen, da ansonsten Messungenauigkeiten auftreten könnten.

In einem neuen Experiment wurde die Decitabine-Konzentration ermittelt, bei der die Zellen eine annähernd normale Vitalität aufweisen. Hierbei wurde die optimale Zellzahl auf einer 96-Wellplatte mit F-Bottom in 100µl Volumen ausgesät. Anschließend wurden die Sarkomzelllinien für den Adhärenzschritt 24 Stunden im Brutschrank belassen. Parallel hierzu wurden verschiedene doppeltkonzentrierte Decitabineverdünnungen in 50µl Medium hergestellt und diese nach Abnahme von 50µl Medium in die entsprechenden Wells pipettiert. Hierbei wurde neben der Mediumkontrolle eine Zellkontrolle (diese Zellen werden nicht mit Decitabine behandelt) mitgeführt. Die Decitabine-Gabe wurde, aufgrund der geringen Halbwertszeit von Decitabine, insgesamt dreimal durchgeführt (jeweils nach genau 24 Stunden). Am Tag 5 wurden 20µl MTS-Reagenz pro Well zugegeben, die Platte zurück in den Brutschrank gestellt und die Platte zum idealen Messzeitpunkt ausgelesen, sowie die Ergebnisse ausgewertet.

2.3.2 Real-time PCR zur Analyse der Antigen-Expression

RNA Isolierung

Zur Analyse der Expression der Antigene auf den Tumorzellen mussten zuerst Zellpellets von den Ursprungszellen, den mesenchymalen Stammzellen und den Skelettmuskelzellen, sowie der unbehandelten und behandelten Tumorzellen angefertigt werden.

Die Lyse der Zellen und die anschließende RNA-Isolierung erfolgte mithilfe des *RNeasy® Plus Mini Kits* (Qiagen) und den *QIAshredder™*-Säulen entsprechend dem Protokoll von Qiagen.

Bestimmung des RNA Gehaltes

Die RNA-Konzentration von 1µl Eluat wurde photometrisch mittels *NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer* (Thermo Fisher Scientific) bei 260nm ermittelt. Als Leerwert wurde RNase-freies Wasser (auch bei der RNA Isolierung verwendet) benutzt. Verunreinigungen durch organische Substanzen werden durch Absorption bei 230nm detektiert und Verunreinigungen durch Proteine bei 280nm. Bei reiner RNA sollte der Quotient der Absorptionen bei 260nm und 280nm zwischen 1,9 – 2,1 liegen, sowie das Verhältnis der Absorptionen bei 260nm und 230nm nicht größer als 1,7 sein.

Die RNA-Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ errechnet sich unter Berücksichtigung des nukleinsäurespezifischen Koeffizienten C (für RNA: 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wie folgt:

$$c [\text{RNA}] = A_{260} (\text{Absorption bei } 260\text{nm}) \times C \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right]$$

Im Anschluss an die Ermittlung des RNA Gehaltes wurde die RNA mit RNA-freiem Wasser auf 100ng/ml eingestellt.

cDNA-Generierung

Die cDNA-Synthese erfolgte mithilfe des *SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit* (Life Technologies). Für eine Reaktion wurden zu 10 μl RNA ($c = 100\text{ng}/\text{ml}$) 10 μl von folgendem, auf Eis hergestellten Mastermix pipettiert:

RNase-freies Wasser	4 μl
5x <i>VILO™ Reaction Mix</i>	4 μl
10x <i>SuperScript® Enzyme Mix</i>	2 μl
(Reverse Transkriptase)	_____
Endvolumen	10 μl

Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Reaktion mithilfe des PCR-Cyclers (*GeneAmp® PCR System 9700* von Life Technologies) entsprechend nachfolgendem Programm:

Amplifikation	42 °C	60min
Abstoppen der Reaktion	85 °C	5min
Kühlung	4 °C	∞

Die cDNA ($c = 50\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde bei -20°C tiefgefroren oder direkt für die PCR verwendet.

PCR und Quantifizierung

Bei der quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) werden die entsprechenden Sequenzen mithilfe des Enzyms *Taq-Polymerase* und der spezifischen *Primer* amplifiziert. In dieser Zeit interkaliert *SYBR-Green* zwischen den Basenpaaren der neu gebildeten DNA. Der Schwellenwertzyklus (*cycle threshold = Ct*) gibt die Anzahl der benötigten Zyklen an, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Anschließend kann die Berechnung der exprimierten mRNA in mehreren Schritten erfolgen (siehe unten). Für die qRT-PCR wurden alle Schritte auf Eis pipettiert. Als erstes wurden alle *Primer* (siehe Tabelle 4) auf 10nM,

ausgehend von 100nM, verdünnt und anschließend ein Mastermix pro Primerpaar (forward und reverse) wie folgt angesetzt:

<i>SYBR</i> [®] <i>Select Master Mix</i>	5µl
<i>Primer forward</i> (10µM)	1µl
<i>Primer reverse</i> (10µM)	1µl
<hr/>	
Endvolumen	7µl

Es wurden pro Probe in drei Wells der 96-Kavitäten-PCR-Platte 7µl Mastermix und je 3µl der 1:3 verdünnten cDNA pipettiert (Triplikate).

Die Reaktion erfolgte im qRT-PCR-Gerät (*CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System* von Bio-Rad Laboratories GmbH) mit folgendem Programm:

UDG Aktivierung	50 °C	2min	} 45x
AmpliTa [®] q DNA Polymerase	95 °C	2min	
Denaturierung	95 °C	15s	
Annealing/Extension	59 °C	30s	

Primer	Sequenz (5' -> 3')	Produktlänge (bp)
MAGE-A1_for B	ACCATCAACTTCACTCGACAGAG	114
MAGE-A1_rev B	GAGGAGCAGAAAACCAACCAAA	
MAGE-A3_for B	ATTCTCGCCCTGAGCAACG	149
MAGE-A3_rev B	CCACTGGCAGATCTTCTCCT	
NY-ESO-1_for B	CGGCAACATACTGACTATCCGA	129
NY-ESO-1_rev B	GCCAAAAACACGGGCAGAAA	
PRAME_for	CTCCTCTCCCACATCCATGC	167
PRAME_rev	ATCACGTGCCTGAGCAACTG	
TBP_for	TGCACAGGAGCCAAGAGTGAA	
TBP_rev	CACATCACAGCTCCCCACCA	

Tabelle 4: Primer mit Sequenzen für die quantitative Real-time PCR

Die Quantifizierung des Genexpressionslevels erfolgte mittels der sehr exakten Form der mRNA-Quantifizierung, der effizienzkorrigierten relativen Quantifizierung ($\Delta\Delta C_t$ Methode) (Pfaffl, 2001). Sobald ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau erreicht wurde, erfolgte die Berechnung der exprimierten mRNA in mehreren Schritten. Als erstes wurde die Menge an mRNA (des

jeweiligen untersuchten Gens) in das Verhältnis zu mRNA-Menge des *Housekeeping-Gens* (TBP = Referenzgen) gesetzt (ΔCt):

$$\Delta Ct = Ct(Gen) - Ct(Referenzgen)$$

Als zweites wurde die mRNA-Konzentration der Zelllinie im Vergleich zur Kontrolle (unbehandelt) betrachtet ($\Delta\Delta Ct$).

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{behandelt}) - \Delta Ct(\text{Kontrolle})$$

Als letztes wurde die Expressionsrate (*fold change* = Expressionsfaktor = E; in %) im Vergleich zur Kontrolle berechnet:

$$E = 2^{-\Delta\Delta Ct} [\%]$$

Hierbei war zu beachten, dass die Werte der Expressionsrate richtig interpretiert wurden:

0 – 0,5	Niedrigere Expression
0,5 – 2	Nicht signifikante Änderung der Expression
>2	Höhere Expression

2.3.3 Zellzyklusanalysen (BrdU-Assay)

BrdU-Assays wurden für die Analyse des Effektes von IFN- γ und TNF- α bzw. T-Zellüberständen auf die Tumorzellen verwendet.

Das hierfür verwendete Kit *FITC BrdU Flow Kit* von BD Bioscience enthält das Thymidin-Analogon 5-Bromo-2-Desoxyuridin, welches in der S-Phase des Zellzyklus für das Nukleosid Thymidin in die neu hergestellte DNA vitaler Zellen eingebaut wird. Das in die DNA eingebaute BrdU wird mit spezifischen Fluorochrom-markierten anti-BrdU-AK gefärbt. Gleichzeitig werden die Zellen mit 7-AAD (7-Aminoactinomycin) gefärbt. Dieses dringt in Zellen mit defekter Zellmembran ein und interkaliert zwischen Cytosin und Guanin. Die Fluoreszenzeigenschaften von 7-AAD werden dadurch so verändert, dass apoptotische Zellen durchflusszytometrisch gemessen werden können. Diese

Färbekombination ermöglicht es, die Zellen ihrer momentanen Zellzyklusphase (G0/G1, S, G2/M und apoptotische Zellen) zuzuordnen. Für den Assay wurden die verwendeten Tumorzellen (WM115, RDES) in 48-Well-Platten (1×10^4 Zellen/ml/Well) ausgesät und zum Adhären über Nacht in den Brutschrank gegeben. Hierbei wurden jeweils zwei Wells pro Kontrolle bzw. Probe angefertigt. Es wurden, neben der Probe, unbehandelte Zellen (nur Medium), eine Negativkontrolle (MOG-Überstände), sowie eine Positivkontrolle ausgesät. Die Positivkontrolle (100 ng/ml IFN- γ und 20 ng/ml TNF- α) diente auch dazu zu testen, ob die Zelllinie fähig ist, in Seneszenz einzutreten. Als Probe wurde zu den Zellen der hergestellte Überstand (siehe 2.1.5) von TA-spezifischen T-Zellen verwendet. Am Tag nach dem Aussäen der Tumorzellen wurden die Zellen mit den entsprechenden Überständen, IFN- γ und TNF- α behandelt oder nur ein Wechsel des Mediums durchgeführt. Am Tag 5 wurden alle Zellen mit frischem Medium, welches BrdU (10 μ M) enthielt, behandelt und für 16 Stunden inkubiert. Nach genau 16 Stunden wurden die Tumorzellen geerntet und gemäß dem Protokoll der Firma BD Bioscience für das *FITC BrdU Flow Kit* behandelt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.4 Generierung von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen und Dendritischen Zellen

2.4.1 Isolierung von PBMCs aus Vollblut von gesunden Spendern

Die *Biocoll Separating Solution* (1,077g/ml, Biochrom AG, RT; Ficoll-Lösung) ist ein hydrophiles Polymer, welches zur Herstellung von wässrigen Lösungen verwendet wird. Durch einen Zentrifugationsschritt (RT, 30 Minuten, 800g, Auslauf und Bremse 1) kommt es zur dichteabhängigen Trennung von Blutbestandteilen. Aufgrund der geringeren Dichte von *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) und Thrombozyten sind diese oberhalb der Ficollschicht zu finden, wohingegen Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte, unterhalb der Ficollschicht anzutreffen sind.

Für die Isolation der PBMCs wurde im Verhältnis 1:2 mit PBS (RT) verdünntes Natrium-heparinisierem Vollblut langsam auf die Ficoll-Lösung geschichtet und zentrifugiert (RT, 30 Minuten, 800g, Auslauf und Bremse 1). Anschließend wurde

die Plasmaschicht entfernt, bevor die zellhaltige Interphase (PBMCs) gewissenhaft und vorsichtig abgenommen und mit PBS gewaschen werden konnte. Daraufhin konnten die PBMCs gezählt und für den anstehenden Versuch in Medium aufgenommen oder eingefroren werden.

2.4.2 Bestimmung der Blutspender

Für die Herstellung von TA-spezifischen T-Zellen mussten zuerst gesunde Spender auf ihre TA-spezifische T-Zell-Frequenz getestet werden. Da diese T-Zell-Frequenz in gesunden Spendern sehr niedrig ist, wurde zur Detektion dieser TA-spezifischen T-Zellen eine *in vitro* Expansion der PBMCs gesunder Spender über elf Tage durchgeführt (T-Zellstimulation und FACS Immunmonitoring mit überlappenden Peptidmischen). Nach der PBMC-Gewinnung wurden diese in TexMACS Medium auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und über Nacht in einem Falcon in den Brutschrank gestellt. Am folgenden Tag (Tag 0) wurden die PBMCs mit TexMACS Medium gewaschen (RT, 300g, 10 Minuten) und anschließend auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und in eine 48-Well-Platte ausgesät (250 μ l/Well entspricht $1,25 \times 10^6$ Zellen/Well). Im Well wurden zu den Zellen überlappende Peptidmische der zu untersuchenden TA in einer Konzentration von 1 μ g/ml zugegeben (zum Beispiel MAGE-A1, MAGE-A3, PRAME, usw.). Drei Wells, welche als Positiv- und Negativkontrollen dienten, wurden ausgespart. An Tag 1 wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 mit TexMACS-Medium verdünnt und IL-2 (10U/ml, PROLEUKIN® von Novartis Pharma), sowie IL-7 (10ng/ml, CellGenix® Recombinant Human Interleukin-7) pro Well zugegeben. An den Tagen 4, 6 und 8 wurde jeweils ein halber Mediumwechsel (250 μ l) mit Zugabe von IL-2 und IL-7 durchgeführt. Am 10. Tag wurden 250 μ l/Well Medium abgenommen und anschließend jedes Well mit 750 μ l TexMACS Medium auf 1ml Endvolumen aufgefüllt. An Tag 11 wurde die Mediummenge auf 250 μ l/Well verringert, die Zellen mit dem entsprechenden überlappenden Peptidmix des TA von Tag 0 restimuliert und Brefeldin A (10 μ g/ml, B7651-5MG von Sigma) zugegeben, um die Zytokinsekretion zu stoppen. Um die IFN- γ sezernierenden Zellen durchflusszytometrisch zu ermitteln wurden die Zellen nach vierstündiger Inkubation im Brutschrank mit extra- und intrazellulären Antikörpern gefärbt

(siehe Tabelle 5). Die Kontrollwells wurden wie folgt behandelt: Positivkontrolle (1 Well, einzige Stimulation an Tag 11 mit SEB), Negativkontrolle 1 (1 Well, keinerlei Stimulation) und Negativkontrolle 2 (je 1 Well/TA, Stimulation mit dem entsprechenden TA an Tag 1 und Restimulation mit MOG (= Negativkontrolle) an Tag 11).

Antikörper (extrazellulär)	Volumen (µl)/Tube	Antikörper (intrazellulär)	Volumen (µl)/Tube
CD3 BV510	2	CD154 PE	5
CD4 AF700	2	IFN-γ PE-Cy7	5
CD56 BUV395	2	IL-2 APC	5
CD8 APC-H7	2,5	TNF FITC	5
LAG-3 PerCP-eFluor 710	2,5		
PD-1 BV421	2,5		
TIM-3 BV-605	2,5		

Tabelle 5: Antikörper-Panel für das Immunmonitoring

2.4.3 T-Zell-Generierung aus PBMCs

Für die T-Zell-Generierung mittels magnetischer Anreicherung von TA-spezifischen T-Zellen wurden nur gesunde Spender ausgewählt, bei denen die Rate an IFN-γ⁺ TA-spezifischen T-Zellen nach elftägiger *in vitro* Expansion mindestens 0,1% betrug. Hierfür wurde entsprechend dem etablierten Protokoll des Labors (Kayser et al., 2015) vorgegangen (siehe Abbildung 5) und folgende drei Schritte durchgeführt.



Abbildung 5: Generierung von Tumor-Antigen-spezifischen T-Zellen

Präsensibilisierung

Nach der Isolierung der PBMCs wurden diese in AB-Medium (RPMI 1640 Medium plus 10% AB-Serum und 1% L-Glutamin) auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und in eine ZKF ausgesät. Insgesamt wurden zu Beginn immer 1×10^8 PBMCs verwendet. Für die Präsensibilisierung wurden $20 \mu\text{l/ml}$ des entsprechenden Tumorantigens (überlappender Peptidmix) von Miltenyi zugegeben (Tag 0), was einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ entspricht. An Tag 1 wurden die Zellen auf 5×10^6 Zellen/ml mit AB-Medium verdünnt und die Zytokine IL-2 (10 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml) zugegeben. An Tag 3 und 5 wurde jeweils ein halber Mediumwechsel durchgeführt und erneut die Zytokine IL-2 und IL-7 zugegeben. Am Abend von Tag 6 wurde eine Zellzählung durchgeführt und die Zellen auf 5×10^6 Zellen/ml in AB-Medium eingestellt. An Tag 7 wurde die Frequenz der IFN- γ^+ T-Zellen mittels Cytokine Secretion Assay (CSA), gemäß dem Protokoll des verwendeten Kits (*IFN- γ Secretion Assay – Cell Enrichment and Detection Kit* (PE), human von Miltenyi), bestimmt. Dies beinhaltete die Ernte der Zellen mit anschließender Restimulation von $2,5 \times 10^6$ Zellen mit dem überlappenden Peptidmix des TA und vierstündiger Inkubation im Brutschrank. Außerdem wurden folgende Kontrollen mitgeführt: Eine Positivkontrolle (SEB, $10 \mu\text{g/ml}$), eine Negativkontrolle (MOG, $1 \mu\text{g/ml}$) und eine Isotypkontrolle (keine Stimulation). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen für fünf Minuten auf Eis mit der IFN- γ *Catch Reagenz* (CD45 Antikörper gekoppelt an einen IFN- γ -spezifischen Antikörper) inkubiert. Anschließend wurde 37°C warmes Sekretionsmedium zugegeben und die Zellen für 45 Minuten auf einem Rotator in den Brutschrank gegeben, so dass die Zellen IFN- γ sezernieren konnten. Die IFN- γ -Sekretion wurde mittels Zugabe von kaltem PBS gestoppt und die Zellen mit folgenden Antikörpern markiert: CD3 APC, CD4 PerCP, CD8 FITC und IFN- γ *Detection* Antikörper (PE). Für die Isotypkontrolle wurden stattdessen folgende Antikörper verwendet: Mouse IgG APC, Mouse IgG PerCP und Simultest FITC/PE. Direkt vor der Messung am FACS Calibur wurde Propidiumiodid (PI) zugegeben, so dass die toten Zellen bei der Messung ausgeschlossen werden konnten. Wenn bei der Messung mindestens 0,1% IFN- γ^+ TA-spezifische T-Zellen gemessen

wurden, konnte der zweite Schritt eingeleitet werden. War dies nicht der Fall, wurde das Vorgehen an Tag 12, 13 oder 14 wiederholt.

Magnetische Anreicherung von TA-spezifischen T-Zellen mittels *IFN- γ* Capture Technik

IFN- γ ⁺ TA-spezifische T-Zellen wurden gemäß dem Protokoll des verwendeten Systems (*CliniMACS® Cytokine Capture System* (IFN- γ) von Miltenyi) magnetisch angereichert. Das Protokoll enthielt die gleichen Schritte wie das bereits beschriebene CSA, allerdings wurden hierbei alle vorhandenen Zellen eingesetzt und der Fluorochrom-konjugierte Antikörper durch einen monoklonalen, murinen IFN- γ Antikörper, der an paramagnetische Eisendextranpartikel gekoppelt war, ersetzt. Dadurch wurde die magnetische Selektion der IFN- γ ⁺ T-Zellen (Positivfraktion) beim Durchfließen der MACS-Säule, die im magnetischen Feld des MACS Separators angebracht wurde, möglich. Die IFN- γ ⁻ T-Zellen (Negativfraktion) flossen durch die Säule und wurden als *Feederzellen* für die Anreicherung aufgehoben, wohingegen die Positivfraktion in der Säule hängen blieb. Die Positivfraktion wurde durch dreimaliges Spülen der Säule mit MACS-Puffer wieder aus der Säule gespült. Der Vorgang wurde zweimal durchgeführt, um alle Zellen der Positivfraktion zu erhalten. Alle Zellen, außer den Kontrollen, durchliefen einen CSA (Tag 7 der Präsensibilisierung) und wurden mit folgenden Antikörpern markiert: CD3 APC, CD4 FITC und IFN- γ Detection Antikörper (PE). Als Kontrollen dienten je 5×10^6 Zellen. Diese wurden für die Positivkontrolle mit SEB und für die Negativkontrolle mit MOG für vier Stunden im Brutschrank inkubiert und mit den gleichen Antikörpern wie die Zellen gefärbt. Außerdem wurde eine Kontrolle nach der Stimulation, aber vor der Zugabe der IFN- γ Anreicherungsreagenz entnommen und ebenfalls mit den gleichen Antikörpern gefärbt. Zusätzlich wurde eine *fluorescence minus one*-Kontrolle (FMO) entnommen. Dies sind Zellen der Negativfraktion, mit denen der IFN- γ Detection Antikörper (PE) überprüft wurde. Direkt vor der Messung am FACSCalibur wurde wiederum PI zugegeben.

Expansion der IFN- γ ⁺ TA-spezifischen T-Zellen

Die durch magnetische Anreicherung selektierten IFN- γ ⁺ TA-spezifischen T-Zellen (Positivfraktion) wurden über 14 Tage expandiert. Hierfür wurde die

Negativfraktion wie in 2.1.4 beschrieben bestrahlt und im Verhältnis 100:1 (*Feederzellen*: Positivfraktion) mit der Positivfraktion vermennt. War die Negativfraktion nicht ausreichend wurden zusätzlich bestrahlte PBMCs vom selben Spender eingesetzt. Die Zellen wurden auf 5×10^6 Zellen/ml AB-Medium eingestellt und unter Anwesenheit von IL-2 (50 U/ml), IL-7 (10 ng/ml) und IL-15 (10 ng/ml, CellGenix® *Preclinical Recombinant Human Interleukin-15*) expandiert. An Tag 3 wurde ein halber Mediumwechsel durchgeführt und erneut die obigen Zytokine (gleiche Konzentration) zugegeben. Von da an wurden Zellzahl und Vitalität alle zwei Tage (5, 7, 9, 11) mit Trypanblau bestimmt und jeweils ein halber Mediumwechsel mit Zytokinzugabe durchgeführt. Die letzte Zytokingabe erfolgte spätestens zwei Tage vor der Ernte und Analyse der Zellen. Bei stark expandierenden Zellen wurden zwischendurch Zellen eingefroren. An Tag 14 wurden die Zellen geerntet, durchflusszytometrisch subphänotypisiert und auf intrazelluläre Zytokine untersucht. Die restlichen Zellen wurden für spätere Versuche kryokonserviert.

2.4.4 Generierung von Dendritischen Zellen

Dendritische Zellen sind antigenpräsentierende Zellen und werden aus Monozyten gebildet. Für ihre Generierung wurden frische oder aufgetaute PBMCs auf 5×10^6 Zellen/ml AB-Medium eingestellt und zur Adhärenz für ein bis zwei Stunden in einer ZKF im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die ZKF dreimal mit warmen PBS gewaschen und die Zellen erneut auf 5×10^6 Zellen/ml AB-Medium eingestellt. Außerdem wurde das Zytokin IL-4 (40 ng/ml, CellGenix® *Preclinical Recombinant Human Interleukin-4*) und GM-CSF (100 ng/ml, LEUKINE® (sargramostim) = *recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor* von Sanofi) zugegeben (Tag 0). Beide Substanzen werden für die Differenzierung der Monozyten in DCs benötigt. Anschließend wurde die ZKF bis Tag 6 im Brutschrank inkubiert. An Tag 6 wurden folgende Zytokine zur Reifung zugegeben: IL-4 (40 ng/ml), GM-CSF (100 ng/ml), sowie IL-1 β (10 ng/ml) (CellGenix® *Preclinical Recombinant Human Interleukin-1 β*), IL-6 (10 ng/ml) (CellGenix® *Preclinical Recombinant Human Interleukin-6*), TNF- α (10 ng/ml) (*Recombinant Human TNF-alpha Protein*, R&D

Systems) und PGE₂ (1 µg/ml, Prostaglandin E₂, Sigma-Aldrich). Anschließend wurde die ZKF wieder in den Brutschrank gestellt. An Tag 7 wurden die DCs durch dreimaliges Spülen der ZKF mit PBS geerntet und anschließend nochmals mit PBS gewaschen (RT, 400g, 5min). Daraufhin wurde eine Zellzählung durchgeführt und einige Zellen für eine durchflusszytometrische Analyse in FACS-Röhrchen gegeben. Die restlichen Zellen wurden direkt für einen Versuch genutzt oder eingefroren.

Für die durchflusszytometrische Analyse wurde eine extrazelluläre Färbung mit folgenden Antikörpern durchgeführt: CD3 APC, CD80 PE, CD83 FITC und Zombie Aqua (0,5 µl/100µl, Lebend-Tot-Färbung). Als Kontrolle wurde eine Isotypkontrolle, welche mit folgenden Antikörpern gefärbt wurde, mitgeführt: mouse IgG₁ APC, mouse IgG₁ FITC und mouse IgG₁ PE. Nach Zugabe der Antikörper wurden die DCs 30 Minuten bei 4° Celsius im Dunkeln inkubiert, mit MACS-Puffer gewaschen (RT, 400g, 5min) und anschließend mit 1% Paraformaldehyd (PFA) für eine spätere Analyse fixiert.

2.5 Analyse der generierten T-Zellen

2.5.1 Subphänotypisierung und Bestimmung von intrazellulären Zytokinen

TA-spezifische T-Zellen produzieren, wenn sie stimuliert werden, Zytokine. Aus diesem Grund muss die Sekretion der Zytokine in die Umgebung für eine durchflusszytometrische Analyse, zum Beispiel mit Brefeldin A, inhibiert werden. Somit reichern sich die Zytokine im endoplasmatischen Retikulum an und können mit intrazellulären Färbungen (Fluorochrom-konjugierte monoklonale Antikörper) detektiert werden.

Zu diesem Zweck wurden die expandierten TA-spezifischen T-Zellen ($1,25 \times 10^6$) zusammen mit DCs ($1,25 \times 10^5$) mit dem entsprechenden überlappenden Peptidmix restimuliert und mit Brefeldin A (10µl/ml, Sigma-Aldrich) für vier Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen (RT, 450g, 4min) und mit einem Mix der extrazellulären Antikörper (siehe Tabelle 6) inkubiert (10 Minuten, dunkel). Im Anschluss daran wurde die Lebend-Tot-Färbung mit Alexa-Fluor 350 (0,5µl AF in 1ml PBS) durchgeführt und die Proben einer erneuten Inkubation (10 Minuten,

dunkel) unterzogen. Nachdem die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen worden waren (RT, 450g, 4min), wurde jedes FACS-Tube mit 100µl der Reagenz A (FIX&PERM® *Cell Fixation and Permeabilization Kit* (CE), Nordic-MUBio BV) fixiert (RT, 15 Minuten, dunkel) und erneut gewaschen (RT, 300g, 10min). Währenddessen wurde ein intrazellulärer Antikörper-Mix (siehe Tabelle 6) mit 100µl Reagenz B (FIX&PERM® *Cell Fixation and Permeabilization Kit* (CE), Nordic-MUBio BV) pro FACS-Tube hergestellt. Reagenz B diente hierbei der Permeabilität der Zellwand. Nach Zugabe des Mixes wurden die Zellen erneut inkubiert (RT, 30 Minuten, dunkel), mit MACS-Puffer gewaschen (RT, 300g, 10min) und im Anschluss mit 1% PFA fixiert oder direkt am LSRII gemessen.

Antikörper (extrazellulär)	Volumen (µl)/Tube	Antikörper (intrazellulär)	Volumen (µl)/Tube
CD3 BV510	2	IFN-γ PE	8
CD4 AF700	2	IL-2 APC	5
CD8 APC-H7	2,5	TNF-α BV421	4
CD56 BV605	2		
CD27 PE-CF594	0,5		
CD28 PE-Cy7	2		
CD45Ro BV785	2		
CD62L FITC	1,5		

Tabelle 6: Antikörper-Panel für die Subphänotypisierung und die Bestimmung der Zytokine

2.5.2 Bestimmung intrazellulärer Zytokine und Zelltodmarker (CD107a-Assay)

Die generierten TA-spezifische T-Zellen wurden auch auf ihr zytotoxisches Potential hin getestet. Hierfür wurde der CD107a-Assay durchgeführt. In diesem kommen zwei verschiedene zytotoxische Marker, CD107a und Granzyme B, zum Einsatz. CD107a (LAMP-1 = Lysosomen-assoziiertes Membranprotein) ist ein an der Zelloberfläche vorkommender Marker für intrazytoplasmatische zytolytische Granula von u.a. Lymphozyten. Das bedeutet, dass die Degranulation der Lymphozyten mit CD107a detektiert werden kann. Da der Marker schnell wieder per Endozytose in die Zelle eingebaut wird, wurde mit dem Ziel einer besseren Detektion des Markers zeitgleich zu der Restimulation und der Zugabe von Monensin A die Färbung mit CD107a durchgeführt. Granzyme B ist eine Serin-Protease und in die Induktion des Zelltodes bzw. der Apoptose involviert.

Für den CD107a-Assay wurden $1,25 \times 10^6$ generierte TA-spezifische T-Zellen mit $1,25 \times 10^5$ DCs pro Tube und dem entsprechenden überlappenden Peptidmix restimuliert. Als Kontrollen wurden SEB (Positivkontrolle) und MOG

(Negativkontrolle) mitgeführt. Direkt am Beginn der Stimulation wurden pro Tube 13,4µl von im Verhältnis 1:20 verdünnten Monensin A (*Protein Transport Inhibitor (Containing Monensin)* von BD) und pro Tube 10µl/ml CD107a APC hinzugegeben. Nach einer vierstündigen Inkubation im Brutschrank wurde eine intrazelluläre Färbung mit der in Tabelle 7 aufgeführten Antikörper durchgeführt. Das weitere Vorgehen entspricht dem von Punkt 2.5.1.

Antikörper (extrazellulär)	Volumen (µl)/Tube	Antikörper (intrazellulär)	Volumen (µl)/Tube
CD3 BV510	2	CD154 PE	5
CD4 AF700	2	Granzym B FITC	10
CD8 APC-H7	2,5	IFN-γ PE-Cy7	5
CD56 BUV395	2		
LAG-3 PerCP-eFluor 710	2,5		
PD-1 BV421	2,5		
TIM-3 BV605	2,5		

Tabelle 7: Antikörper-Panel für die Bestimmung intrazellulärer Zytokine und Zelltodmarker

2.5.3 Bestimmung des Proliferationspotentials (CFSE-Assay)

Um das Proliferationspotential der generierten TA-spezifischen T-Zellen zu untersuchen wurde der CFSE-Assay durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit CFSE (Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester), einem Farbstoff, der kovalent an sekundäre Aminogruppen in und auf der Zelle bindet, gefärbt. Da CFSE die Zellfunktion nicht beeinträchtigt und mit jeder Zellteilung der CFSE-Farbstoff halbiert wird, ist die Messung der DNA-Syntheserate und somit indirekt die Messung des Proliferationspotentials der Zellen möglich. An Tag 0 wurden die T-Zellen (in 1ml PBS) mit 1,6µM CFSE-Lösung (in PBS, CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, for flow cytometry, Invitrogen, FITC) vermengt und für exakt neun Minuten im Brutschrank inkubiert. Direkt im Anschluss an die Inkubationszeit wurden 4ml FCS hinzugegeben. Nach zweiminütiger Inkubation bei RT wurden die Zellen mit 6ml RPMI-Medium (ohne Zusätze) gewaschen (RT, 300g, 10min). Daraufhin wurden die Zellen in AB-Medium resuspendiert und auf 4×10^6 Zellen/ml eingestellt. Auf einer 48-Wellplatte wurden 1×10^6 T-Zellen/Well (250 µ) mit 1×10^5 DCs/Well (250 µl) mit überlappenden Peptidmischen restimuliert. Im Falle der Verwendung von PBMCs wurden keine DCs benötigt. Folgende Kontrollen wurden mitgeführt: Eine Positivkontrolle (SEB), eine Negativkontrolle (ungefärbt und unstimuliert), eine zweite Negativkontrolle (gefärbt mit CFSE,

nicht stimuliert) und eine dritte Negativkontrolle (MOG). An Tag 1 wurde jedes Well auf 1ml mit AB-Medium aufgefüllt (Zugabe von 500 µl) und die Wellplatte bis zu Tag 6 im Brutschrank belassen. An Tag 6 wurde zuerst das Volumen auf 500 µl/Well reduziert und anschließend die Peptivatoren (10µl für die TA und MOG, 5µl SEB auf 500µl) und Brefeldin A (10µg/ml) zugegeben. Daraufhin wurden die Zellen für vier Stunden im Brutschrank inkubiert und im Anschluss daran eine intrazelluläre Färbung entsprechend 2.5.1 mit den Antikörpern von Tabelle 8 durchgeführt.

Antikörper (extrazellulär)	Volumen (µl)/Tube	Antikörper (intrazellulär)	Volumen (µl)/Tube
B7H3 PE	2,5	IFN-γ PE-Cy7	5
CD3 BV510	2	TNF-α APC	5
CD4 AF700	2		
CD8 APC-H7	2,5		
LAG-3 PerCP-eFluor 710	2,5		
PD-1 BV421	2,5		
TIM-3 BV605	2,5		

Tabelle 8: Antikörper-Panel für die Bestimmung des Proliferationspotentials

2.5.4 Immuncheckpoint-Inhibition

Blockierende Antikörper gegen B7-H3, LAG3, PD1 und TIM3 wurden teilweise im CD107a- und CFSE-Assay mitgeführt, um ermitteln zu können, ob aus der Immuncheckpointblockade eine langanhaltendere und effizientere Aktivierung der T-Zellen resultiert. Die blockierenden Antikörper wurden direkt nach der Antigen-Stimulation zugegeben und in einer Konzentration von 5µg/ml eingesetzt. Beim CFSE-Assay war jedoch eine zweimalige Gabe nötig. Welche Antikörper eingesetzt wurden ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Antikörper	Klon	Hersteller
B7H3	MIH35	BioLegend
LAG-3	11E3	Enzo Life Science
PD-1	EH12.2H7	BioLegend
TIM-3	F38-2E2	BioLegend

Tabelle 9: Antikörper für die Immuncheckpoint-Inhibition.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung von spezifischen Tumorantigenen in Sarkom- und Melanomzelllinien

3.1.1 Durchflusszytometrische Analyse der Tumorzelllinien auf die Expression von B7-H3 und ROR1

B7-H3, auch als *Cluster of Differentiation 276* (CD276) bekannt, ist ein Transmembranprotein, welches in vielen Tumorzelllinien überexprimiert wird und an der Immunantwort beteiligt ist. Aus diesem Grund wurden die eingesetzten Sarkomzelllinien (A673, RDES, SaOS, U2OS) durchflusszytometrisch auf ihre Expression von B7-H3 untersucht. Hierbei ergab sich bei allen vier Zelllinien eine erhöhte Expression von B7-H3: 99,85% (A673), 95,84% (RDES), 76,39% (SaOS) und 53,95% (U2OS). Zum Vergleich mit anderen Krebsarten wurden noch die Rhabdomyosarkomzelllinien ZF, RH30, RD und SRH, sowie die Melanomzelllinien WM115, WM853 und WM1205 auf die Expression von B7-H3 untersucht. Diese zeigten ebenfalls fast alle hohe Expressionsraten: 98,05% (ZF), 47,91% (RH30), 95,94% (RD), 18,53% (SRH), 99,28% (WM115), 28,53% (WM853) und 89,73% (WM1205).

Des Weiteren wurden die Tumorzelllinien durchflusszytometrisch auf ihre Expression von ROR1, einen Tyrosinkinase-Transmembranrezeptor, untersucht. Dieser kommt auf soliden Tumoren, aber auch auf natürlichen Geweben, wie zum Beispiel der Nebenschilddrüse, vor. Alle untersuchten Tumorzelllinien wiesen ebenfalls eine erhöhte ROR1-Expression auf: 37,19% (A673), 90,53% (RDES), 65,24% (SaOS) und 36,33% (U2OS). Erneut wurden auch Rhabdomyosarkom- und Melanomzelllinien untersucht, welche ebenfalls alle positiv auf den Transmembranrezeptor ROR1 waren: 97,15% (RH30), 83,44% (RD), 14,11% (SRH), 74,02% (EST094), 25,77% (SBCL2), 97,29% (SK-Mel 28) und 32,59% (WM115).

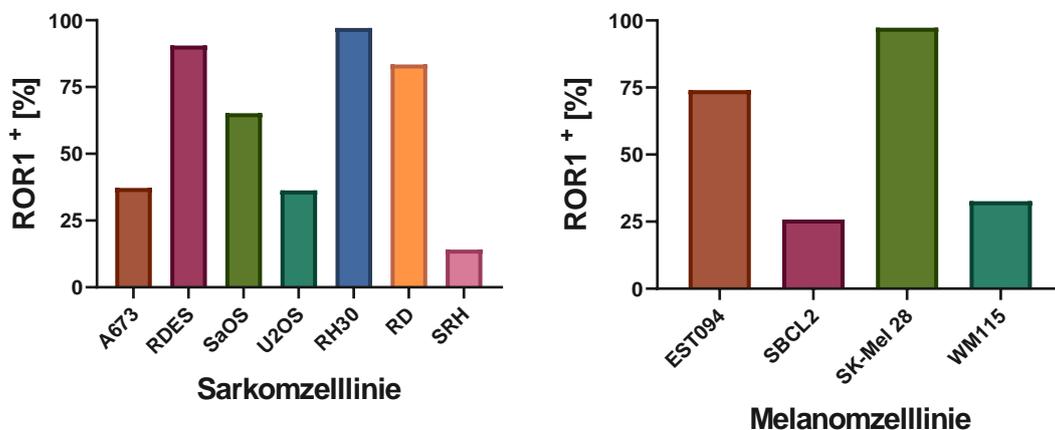


Abbildung 6: ROR-1 Expression von Ewing, Osteo- und Rhabdomyosarkomen, sowie Melanomen.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen ergaben, dass alle getesteten Tumorzelllinien sowohl B7-H3, als auch ROR1 (siehe Abbildung 6) auf ihrer Oberfläche exprimieren, wobei die Expressionsstärke von der Tumorzelllinie abhängig ist.

3.1.2 Identifizierung der Tumorantigen-Expression

Zur Identifizierung der Tumorantigen-Expression (TA-Expression) in den Ewing (A673 und RDES) und Osteosarkomen (SaOS und U2OS) wurden zuerst qRT-PCRs der Referenz- bzw. Kontrollzellen durchgeführt. Hierbei handelt es sich im Falle der Sarkome um mesenchymale Stammzellen (MSC) und Skelettmuskelzellen ohne und nach Decitabine-Behandlung. Die Kontrollzellen exprimierten unbehandelt keine Cancer-Testis-Antigene. Nach einer Behandlung mit Decitabine zeigten sowohl die mesenchymalen Stammzellen, als auch die Skelettmuskelzellen eine sehr schwache *de novo* Expression der CTA MAGE-A1, MAGE-A3, NY-ESO-1 und PRAME (Ct > 39).

Anschließend wurden die Ewing (A673 und RDES) und Osteosarkomzelllinien (SaOS und U2OS) auf die Expression der CTA untersucht. Alle Zelllinien mit Ausnahme des Ewing Sarkoms RDES exprimierten die vier CTA ohne eine Behandlung mit Decitabine. Das Ewing Sarkom RDES zeigte unbehandelt keine Expression des CTA NY-ESO-1. Die CTA-Expression im Verhältnis zur Behandlung mit Decitabine ist unter Punkt 3.2.2 aufgeführt.

3.2 Epigenetische Modulation der Tumor-Antigen-Expression

3.2.1 Ermittlung der optimalen Zellzahl und der tolerierten Decitabine-Konzentration

Ab einer bestimmten Konzentration wirkt Decitabine toxisch auf Zellen. Aus diesem Grund musste für jede Tumorzelllinie die nicht-toxische Decitabine-Konzentration herausgefunden werden. Um diese Konzentration mittels MTS-Assay ermitteln zu können, musste zuvor die optimale Zellzahl, die pro Well einer 96-Wellplatte ausgesät werden sollte, festgestellt werden. Hierfür wurden die Ewing- und Osteosarkomzellen in bestimmten Zellzahlen pro Well ausgesät (1.000; 2.500; 5.000 und 10.000). Nach 24-stündiger Adhäsion und anschließender 72-stündiger Inkubation, also insgesamt 96 Stunden, wurde MTS-Reagenz zugegeben. Die Absorption wurde nach einer, zwei und drei Stunden am *Microplate Reader* gemessen. Hierbei sollte die Optische Dichte (OD), nach Abzug der Referenzwellenlänge und der Mediumkontrolle, etwa 1 betragen und die Konfluenz im Well bei 80-90% liegen, so dass in weiteren Versuchen konstante und zuverlässige Messungen durchführbar sein würden. Es ergaben sich folgende Zellzahlen pro Well, mit denen die weiteren Versuche gemacht wurden: 2.500 (A673), 1.000 (RDES), 10.000 (SaOS) und 5.000 (U2OS). Die Inkubationszeit des MTS-Reagenzes betrug drei Stunden für das Ewing Sarkom A673, eine Stunde für das Ewing Sarkom RDES und jeweils zwei Stunden für die beiden Osteosarkome (SaOS und U2OS). Im Folgeexperiment wurde untersucht, welche Decitabine-Konzentration von den Tumorzelllinien toleriert wird. Dafür wurden die Zellen, nach ihrer Adhärenz, über drei Tage mit fünf unterschiedlichen Decitabine-Konzentrationen (0,5µM; 1µM; 2,5µM; 5µM und 10µM) behandelt. 24 Stunden nach der letzten Decitabine-Gabe wurde den Wells MTS-Reagenz zugegeben und die Vitalität entsprechend dem Vorversuch am *Microplate Reader* gemessen (%; siehe Abbildung 7). Für die Bestimmung der Vitalität (%), dienten unbehandelte Zellen der jeweiligen Zelllinie als Kontrolle (Ktr.). Pro Zelllinie wurden drei unabhängige Experimente mit Triplikaten durchgeführt, so dass ein Balken den Mittelwert dieser drei Experimente und

deren Standardabweichung darstellt. Die karierten Balken stehen für die ausgewählte, für die weiteren Versuche verwendete, Decitabine-Konzentration.

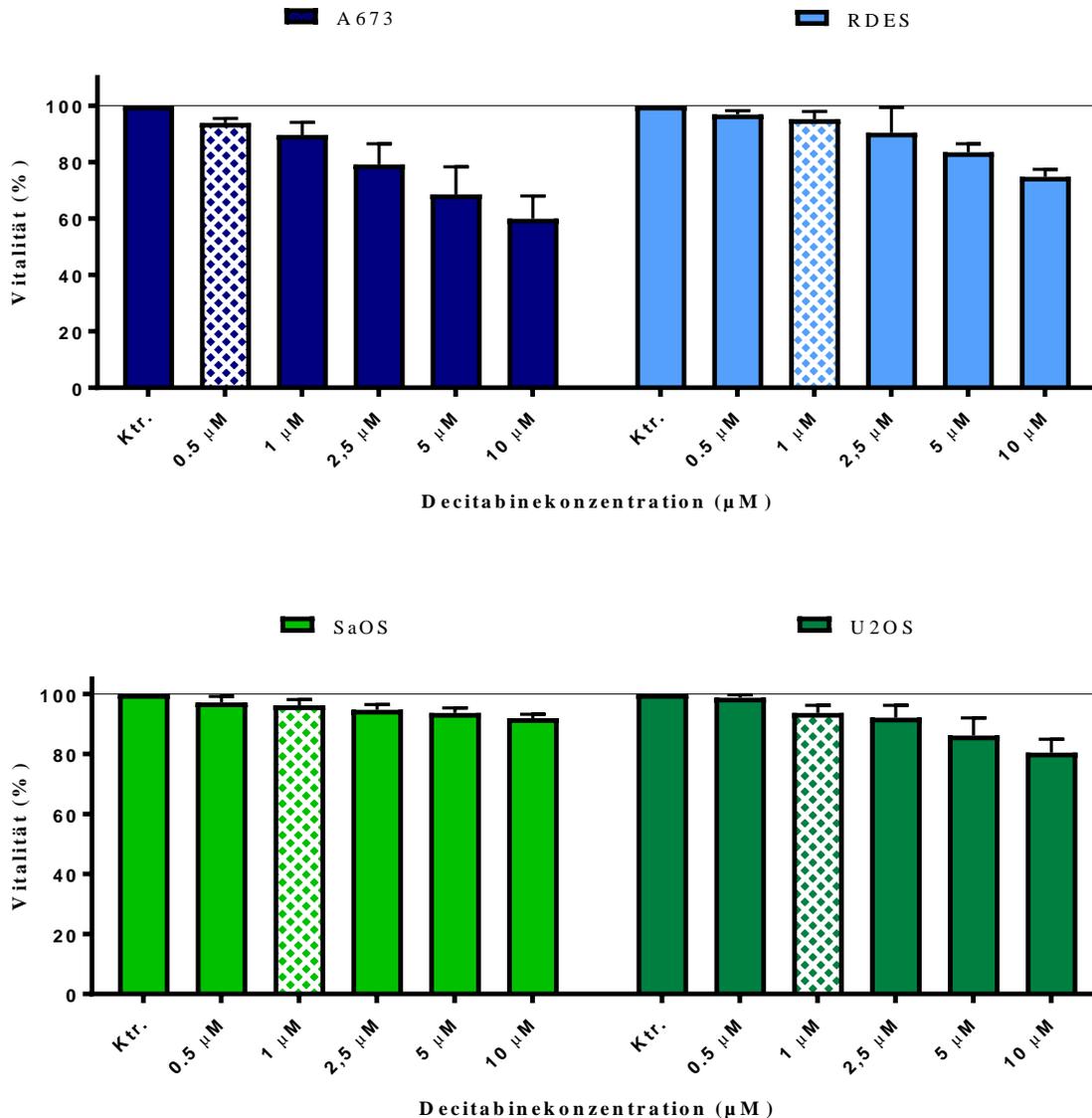


Abbildung 7: Ermittlung der optimalen Decitabine-Konzentration.

Die gewählte Decitabine-Konzentration lag bei allen Zelllinien bei 1µM, außer beim Ewing Sarkom A673. Für dieses wurde eine 0,5µM Decitabine-Verdünnung verwendet. Alle vier untersuchten Sarkomzelllinien reagierten auf die Decitabine-Lösung, wobei das Ewing Sarkom A673 die sensibelste Zelllinie war und das Osteosarkom SaOS die unsensibelste.

3.2.2 Tumorantigen-Expression nach Decitabine-Behandlung

Die Tumorantigen-Expression der einzelnen Zelllinien nach Decitabine-Behandlung, einem DNA-Methyltransferaseinhibitor, wurde mittels MTS-Assays und anschließender qRT-PCR ermittelt. Als Referenz wurden unbehandelte Tumorzellen der jeweiligen Zelllinie mitgeführt. Für den MTS-Assay wurden die Sarkomzelllinien nach 24-stündiger Adhärenzphase für fünf Tage (jeweils nach exakt 24 Stunden) mit der ermittelten Decitabine-Konzentration (siehe 3.2.1 und Abbildung 7) behandelt. Im Anschluss daran wurde die mRNA Expression der CTA MAGE-A1, MAGE-A3, NY-ESO-1 und PRAME anhand von qRT-PCRs analysiert. Diese Ergebnisse wurden über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode ausgewertet (Verhältnis der mRNA-Menge zum Referenzgen (TBP), Vergleich zu unbehandelten Zellen der entsprechenden Zelllinie und anschließender Berechnung des Expressionsfaktors = *fold change*; siehe 2.3.2). Alle vier Tumorantigene waren bereits in den vier Tumorzelllinien exprimiert, mit Ausnahme des Tumorantigens NY-ESO-1 beim Ewing Sarkom RDES. Hier führte die Decitabine-Behandlung zu einer signifikanten *de novo* Expression des CTAs.

Das CTA MAGE-A1 wurde in beiden Ewing Sarkomen hochreguliert, wohingegen es keine signifikante Veränderung der Expression für die Osteosarkome gab. Abzulesen sind diese Veränderungen der Expression an der Expressionsrate (*fold change*): 2.323 (A673), 237 (RDES), 1 (SaOS), 1,7 (U2OS). Das CTA MAGE-A3 wurde in beiden Ewing Sarkom Zelllinien und bei der Zelllinie U2OS leicht hochreguliert. Keine signifikante Expressionsveränderung zeigte sich bei dem Osteosarkom SaOS: 672 (A673), 21 (RDES), 1,7 (SaOS) und 3,5 (U2OS).

Die Expression des CTA NY-ESO-1 hingegen wurde bei allen Zelllinien, bis auf das Ewing Sarkom RDES, hochreguliert: 9.345 (A673), 37(SaOS) und 16.262 (U2OS). Das Ewing Sarkom RDES exprimierte NY-ESO-1 vor der Behandlung mit 1 μM Decitabine-Lösung nicht, so dass eine *fold change* Berechnung nicht möglich war. Es konnte aber eine signifikante *de novo* Expression mit einem Ct-Mittelwert von 25,56 und einer Standardabweichung von $\pm 0,39$ erreicht werden (fünf unabhängige Experimente, pro Experiment unabhängige Triplikate).

Das CTA PRAME wurde bei den Ewing Sarkomen hochreguliert, wohingegen es bei den Osteosarkomen zu keiner signifikanten Veränderung der Expression kam: 7,4 (A673), 4.006 (RDES), 1 (SaOS) und 1 (U2OS).

Die Expressionsfaktoren der einzelnen CTA sind in Abbildung 8 für die jeweilige Tumorzelllinie aufgeführt.

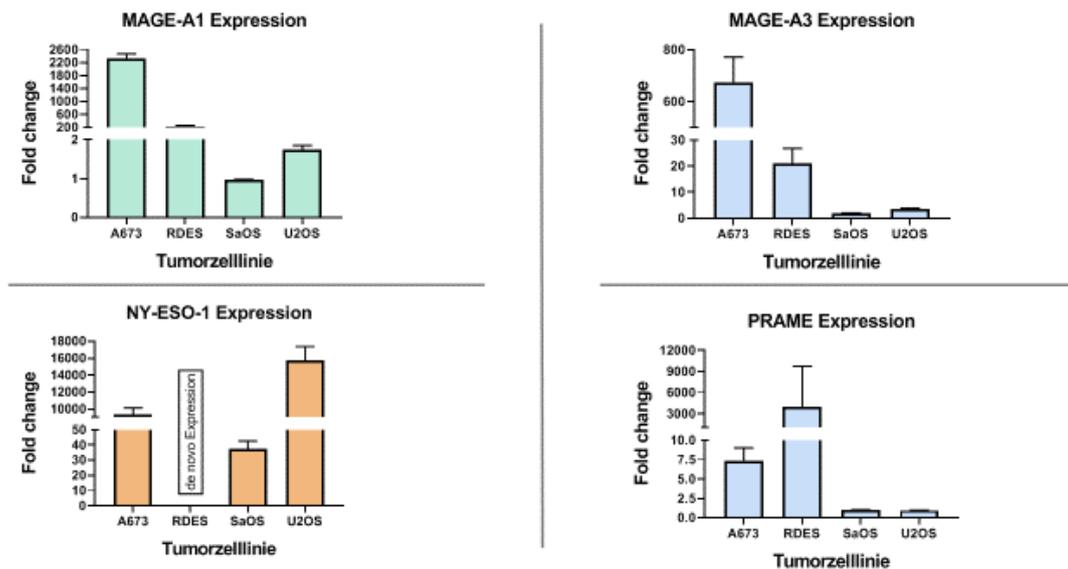


Abbildung 8: Expression der Tumorantigene MAGE-A1, MAGE-A3, NY-ESO-1 und PRAME.

Bei beiden Ewing Sarkomen ergab sich eine teils sehr starke Hochregulation der CTA-Expression von MAGE-A1, MAGE-A3, NY-ESO-1 und PRAME (siehe Abbildung 8). Eine Ausnahme bildete die Zelllinie RDES, bei welcher es sogar zu einer *de novo* Expression des CTAs NY-ESO-1 kam. Bei den zwei Osteosarkomen konnte nur beim CTA NY-ESO-1 eine signifikante Veränderung, in beiden Fällen eine Hochregulation, der CTA-Expression durch die Decitabine-Behandlung festgestellt werden. Ebenfalls zu einer Hochregulation der TA-Expression, in diesem Fall von MAGE-A3, kam es bei der Zelllinie U2OS.

3.3 Generierung von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen von T-Zellspendern

3.3.1 Bestimmung potentieller T-Zellspender

Um geeignete, gesunde Spender für die Anreicherung von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen zu finden wurden *in vitro* T-Zellstimulationen und FACS-Immunmonitorings mit überlappenden Peptidmischen (MAGE-A3, PRAME und ROR1) von verschiedenen freiwilligen Spendern über 11-13 Tage durchgeführt (für das methodische Vorgehen siehe 2.4.2). Am Tag der durchflusszytometrischen Auswertung wurde ein *Cytokine Secretion Assay* angefertigt, welcher testete, ob ausreichend IFN- γ^+ CD4 $^+$ Zellen vorhanden sind, so dass eine magnetische Anreicherung (IFN- γ^+) und Expansion durchgeführt werden kann. Der Fokus lag auf den Tumorantigen-spezifischen CD4 $^+$ T-Zellen, da diese neben ihrer Hilfsfunktion auch dazu in der Lage sind, Seneszenz, einen stabilen Wachstumsstillstand, zu induzieren. Als Kriterium für eine positive Reaktion gilt: Mehr als 0,1% an IFN- γ^+ CD4 $^+$ T-Zellen bei mehr als 100 detektierten Events und einem mindestens doppelt so hohen Prozentsatz an positiven Zellen gegenüber den nicht präsensibilisierten Zellen (= Negativkontrolle).

Die Ergebnisse von Spenderin 1 (geboren 1968) waren sowohl in Hinblick auf die relevanten TA-spezifischen IFN- γ^+ CD4 $^+$ T-Zellen, als auch im Hinblick auf die Anzahl an CD3 $^+$, CD4 $^+$ und CD8 $^+$ Zellen sehr gut (siehe Tabelle 10). Als relevant wurden diejenigen Tumorantigene betrachtet, gegen welche CD4 $^+$ T-Zellen generiert werden sollten (MAGE-A3, PRAME und ROR1). Spenderin 1 war für weitere Tumorantigene positiv (IFN- γ^+ CD4 $^+$ T-Zellen): MAGE-A1 (0,58%) und NY-ESO-1 (0,73%).

	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	IFN- γ ⁺ CD4 ⁺ (%)	IFN- γ ⁺ CD8 ⁺ (%)
MAGE-A3	82,13	77,79	19,91	1,5	0,17
PRAME (1)	88,10	83,66	14,15	5,48	0,06
ROR1	79,04	80,71	16,93	1,63	2,05

Tabelle 10: Zellzahlen (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen) von Spenderin 1 nach 13-tägiger in vitro Stimulation mit überlappenden Peptidmischen der entsprechenden Tumorantigene.

Eine zweite Spenderin (geboren 1958), von welcher PRAME-spezifische IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen generiert werden sollten, zeigte ebenso gute Zellzahlen wie Spenderin 1 (siehe Tabelle 11). Außerdem war sie für folgende weitere Tumorantigene positiv (IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen): MAGE-A3 (1,48%), NY-ESO-1 (0,36%) und ROR1 (3,74%).

	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	IFN- γ ⁺ CD4 ⁺ (%)	IFN- γ ⁺ CD8 ⁺ (%)
PRAME (2)	74,94	71,72	22,24	5,30	0,01

Tabelle 11: Zellzahlen (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen) von Spenderin 2 nach 11-tägiger in vitro Stimulation mit PRAME-überlappenden Peptidmischen.

Ein dritter Spender (geboren 1991), von welchem ebenfalls PRAME-spezifische IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen generiert werden sollten, zeigte ebenfalls gute Zellzahlen (siehe Tabelle 12). Außerdem war er für folgende weitere Tumorantigene positiv (IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen): MAGE-A1 (2,28%) und MAGE-A3 (0,38%).

	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	IFN- γ ⁺ CD4 ⁺ (%)	IFN- γ ⁺ CD8 ⁺ (%)
PRAME (3)	84,85	63,49	28,17	2,04	0,00

Tabelle 12: Zellzahlen (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen) von Spender 3 nach 11-tägiger in vitro Stimulation mit PRAME-überlappenden Peptidmischen.

Die getesteten Spender waren für die relevanten Tumorantigene positiv, so dass im nächsten Schritt mit der Generierung von Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen begonnen werden konnte.

3.3.2 Generierung von Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen

Das Ziel der Generierung war, möglichst viele Tumorantigen-spezifische IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen hoher Funktionalität (T_H1-Zellen) zu generieren. Es wurden insgesamt fünf unabhängige Läufe zur Generierung von TA-spezifischen T-Zellen durchgeführt. In einer Generierung wurden MAGE-A3-spezifische T-Zellen, in drei weiteren jeweils PRAME-spezifische T-Zellen und in einem letzten Lauf ROR1-spezifische T-Zellen generiert. Für die drei unterschiedlichen Tumorantigene MAGE-A3, PRAME und ROR1 wurde Spenderin 1 ausgewählt, da sie für alle drei Tumorantigene in der 13-tägigen *in vitro* T-Zellstimulation mit überlappenden Peptidmischen positiv war. Spenderin 2 war ebenfalls für alle drei Tumorantigene positiv, stand aber nicht ständig zur Blutentnahme zur Verfügung, weswegen Spenderin 1 für die Generierung verschiedener Tumorantigen-spezifischer T-Zellen ausgewählt wurde. Von Spenderin 2 und Spender 3 wurden PRAME-spezifische T-Zellen generiert. Die PRAME-Läufe wurden entsprechend der Spenderbezeichnung mit 1-3 deklariert (Spenderin 1 = PRAME (1) usw.). Die vitalen Zellen, und somit die Zellzahl, wurden zu vier Zeitpunkten bestimmt: Zu Beginn des Protokolls, nach der Präsensibilisierung mit überlappenden Peptidmischen, nach der magnetischen Anreicherung und am Ende der Expansion (siehe Abbildung 9). Zu Beginn des Protokolls wurden stets 1×10^8 PBMCs eingesetzt. Nach einer siebentägigen Präsensibilisierung der PBMCs mit überlappenden Peptidmischen wurde eine vierstündige Restimulation mit dem jeweiligen Tumorantigen durchgeführt. War im anschließenden *Cytokine Secretion Assay* ein positives Ergebnis durchflusszytometrisch messbar, wurde eine magnetische Anreicherung der IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen mit nachfolgender 14-tägiger Expansion gestartet. Lag zu diesem Zeitpunkt noch ein negatives Ergebnis vor (PRAME (2) und PRAME (3)), wurde die Präsensibilisierung auf elf Tage, entsprechend dem Immunmonitoring, verlängert, und erneut eine Restimulation und ein CSA durchgeführt, an welchen sich die Anreicherung und Expansion anschloss (Protokoll siehe Abbildung 5).

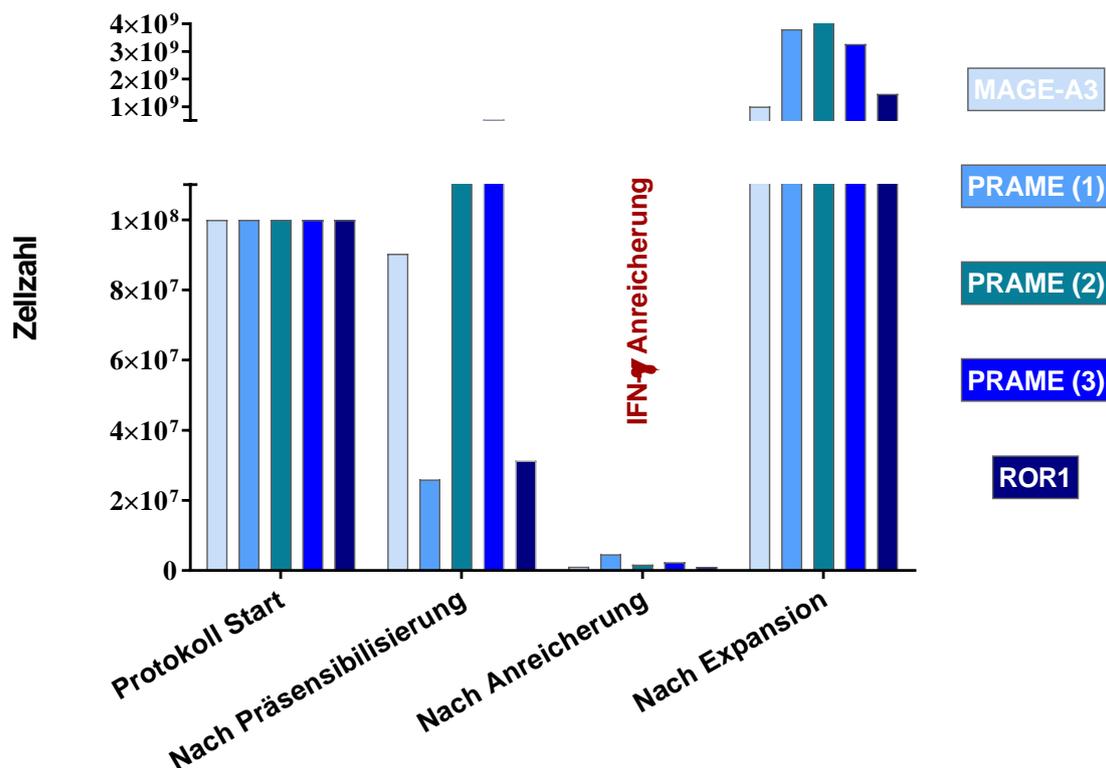


Abbildung 9: Zellzahlen der fünf unabhängigen Generierungen von Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des Herstellungsprotokolls.

Die Menge an Zellen, die nach der Anreicherung erreicht wurden (PosFra), konnte, außer bei der Generierung von ROR1-spezifischen T-Zellen nicht komplett weiterverarbeitet werden, da für die Expansion ein Verhältnis der NegFra (*Feeder Zellen*) zur PosFra von 100:1 nötig ist. Zusätzlich vermehrten sich die Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen während der letzten Tage der Expansion derart rasant, dass Zellen an Tag 11 eingefroren werden mussten. Eine Ausnahme bildete die Generierung der MAGE-A3 und PRAME (3) spezifischen T-Zellen. Hier wurden an Tag 11 keine Zellen eingefroren. Es musste trotzdem bei jeder Generierung von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen eine Kalkulation der Zellzahl nach der Expansion vorgenommen werden, da entweder nicht die gesamte Menge der PosFra eingesetzt wurde oder bzw. und Zellen an Tag 11 eingefroren werden mussten. Aus diesem Grund sind in Tabelle 13, neben der Zellzahl zu Beginn des Protokolls und nach der Anreicherung, auch die berechneten Zellzahlen nach der Expansion, sowie der Expansionsfaktor (Faktor, um den sich die Zellen in der Expansion vermehrt haben) aufgelistet. Bei

den MAGE-A3 spezifischen CD4⁺ T-Zellen hätten, wenn nach der Präsensibilisierung alle Zellen verwendet worden wären, noch mehr Zellen generiert werden können. Dies wurde aber in der Hochrechnung nicht berücksichtigt, da sich der Faktor nur auf die Expansion bezieht. Wäre die ganze Menge an Zellen nach der Präsensibilisierung eingesetzt worden und die Bedingungen wären dieselben gewesen, wären nach der Expansion 2,84 x 10⁹ Zellen vorgelegen.

	Protokoll Start	Nach Anreicherung = PosFra	Nach Expansion	Expansionsfaktor
MAGE-A3	1x10 ⁸	1,1x10 ⁶	1,01x10 ⁹	923,79
PRAME (1)	1x10 ⁸	4,7x10 ⁶	3,81x10 ⁹	816,68
PRAME (2)	1x10 ⁸	1,7x10 ⁶	16,65x10 ⁹	9.791,78
PRAME (3)	1x10 ⁸	2,4x10 ⁶	3,27x10 ⁹	1.361,44
ROR1	1x10 ⁸	1,1x10 ⁶	1,47x10 ⁹	1.397,76

Tabelle 13: Zellzahlen zu verschiedenen Zeitpunkten des Protokolls. Der Expansionsfaktor wurde für die Berechnung der Zellzahl nach der Expansion eingesetzt, da teilweise Zellen eingefroren werden mussten.

Die generierten Zellen expandierten nicht nur sehr gut, sondern zeigten nach der Anreicherung auch eine sehr gute Vitalität mit über 92% (Mittelwert 96,06% ± 2,15). Zusätzlich wurden die Zellen auch dahingehend untersucht, wieviel Prozent der Zellen IFN-γ⁺ CD3⁺, IFN-γ⁺ CD4⁺ und/oder IFN-γ⁺ CD8⁺ waren (siehe Tabelle 14). Besonders hohe Ergebnisse an IFN-γ⁺ CD4⁺ T-Zellen (> 89%) wurden in den Läufen MAGE-A3 und PRAME (2) erzielt. Ein vergleichsweise niedriger Wert an IFN-γ⁺ CD4⁺ T-Zellen wurde mit der Generierung von PRAME (3) spezifischen T-Zellen erreicht (40,27%). Der Mittelwert lag bei 71,30% ± 18,26.

	Vitalität	IFN- γ ⁺ CD3 ⁺	IFN- γ ⁺ CD4 ⁺	IFN- γ ⁺ CD8 ⁺
MAGE-A3	96,35	96,57	89,26	6,78
PRAME (1)	99,16	78,25	64,29	12,86
PRAME (2)	96,25	91,46	89,42	2,83
PRAME (3)	96,14	48,30	40,27	8,88
ROR1	92,41	81,55	73,25	5,82

Tabelle 14: Zelltyp in Prozent nach der Anreicherung. Die Prozentzahl der IFN- γ ⁺ Zellen entspricht dem Prozentsatz an IFN- γ ⁺ Zellen nach Abzug der Negativkontrolle (MOG).

Eine weitere durchflusszytometrische Untersuchung der generierten Zellen fand nach der Expansion statt. In Tabelle 15 ist neben der Vitalität der expandierten Zellen auch der prozentuale Anteil an CD3⁺/CD56⁻, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen aufgeführt. Es ist zu erkennen, dass vorwiegend CD4⁺ T-Zellen expandiert wurden. Eine Ausnahme bildete die Expansion von PRAME (3) spezifischen T-Zellen. Hierbei wurden vergleichsweise viele CD8⁺ T-Zellen expandiert (23,51%).

	Vitalität	CD3 ⁺ /CD56 ⁻	CD4 ⁺	CD8 ⁺
MAGE-A3	94,32	84,26	94,96	2,39
PRAME (1)	59,60	95,48	91,88	4,44
PRAME (2)	94,76	89,38	81,27	8,47
PRAME (3)	92,66	61,97	62,33	23,51
ROR1	63,57	87,94	83,87	9,72

Tabelle 15: Zelltyp in Prozent nach der 14-tägigen Expansion. Die Prozentzahl der IFN- γ ⁺ Zellen entspricht dem Prozentsatz an IFN- γ ⁺ Zellen nach Abzug der Negativkontrolle (MOG).

3.3.3 Phänotyp der generierten CD4⁺ Tumorantigen-spezifischen T-Zellen und deren Zytokinprofil

Des Weiteren wurden die generierten Tumorantigen-spezifischen T-Zellen auf ihren Phänotyp mittels Differenzierungsmarker (CD27, CD28, CD45RO und CD62L) und ihre sezernierten T_H1 Zytokine (IFN- γ , IL-2 und TNF- α) untersucht. Die Mehrheit der IFN- γ sezernierenden CD4⁺ T-Zellen waren T-Gedächtniszellen des Effektorstyps, definiert als CD45RO⁺/CD62L⁻ Zellen (95,14% \pm 3,34%). Zentrale T-Gedächtniszellen (CD45RO⁺/CD62L⁺) waren, ebenso wie naive T-

Zellen (CD27⁺/CD28⁺), kaum vorhanden (T_{CM}: 0,13% ± 0,12%; naive T-Zellen: 0,07% ± 0,10). Eine Analyse der verschiedenen generierten Tumorantigen-spezifischen T-Zellen nach einer Stimulierung mit den jeweiligen überlappenden TA-Peptidmischen ergab, dass alle CD4⁺ T-Zellen IFN- γ , IL-2 und TNF- α sezernierten. Die höchste Sekretion gab es nach Abzug der Negativkontrolle (MOG) von TNF- α (55,07% ± 13,97). Die zweithöchste Sekretion erfolgte für IFN- γ (48,83% ± 14,43), wobei das Zytokin, welches am wenigsten sezerniert wurde, IL-2 (26,38% ± 14,06) war. In Abbildung 10 ist eine durchflusszytometrische Analyse für die Zytokin-Ausschüttung der PRAME (1) spezifischen T-Zellen beispielhaft dargestellt. Die genauen Zahlen sind, genauso wie die einzelnen Prozentzahlen der Sekretion von IFN- γ ⁺/TNF- α ⁺ (45,51% ± 14,25), IFN- γ ⁺/IL-2⁺ (24,90% ± 13,28) und TNF- α ⁺/IL-2⁺ (26,17% ± 13,39), in Tabelle 16 nachzulesen.

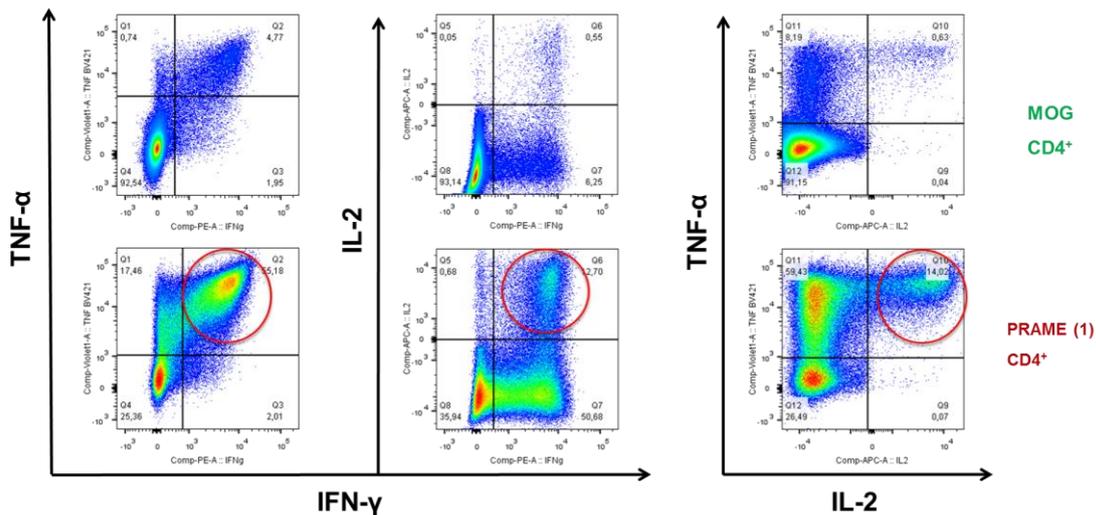


Abbildung 10: T_{H1} Zytokinprofil der generierten PRAME (1) spezifischen T-Zellen.

	IFN- γ ⁺	TNF- α ⁺	IL-2 ⁺	IFN- γ ⁺ / TNF- α ⁺	IFN- γ ⁺ / IL-2 ⁺	TNF- α ⁺ / IL-2 ⁺
MAGE-A3	28,79	31,96	18,98	26,52	17,47	18,58
PRAME (1)	55,40	64,74	12,78	50,41	12,15	13,39
PRAME (2)	59,05	61,69	35,38	57,04	34,03	34,44
PRAME (3)	66,07	70,33	49,65	62,52	46,55	48,56
ROR1	34,86	46,61	15,12	31,07	14,29	15,87

Tabelle 16: Prozentuale Sekretion von IFN- γ , TNF- α und IL-2 der TA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen nach Abzug der Negativkontrolle (MOG).

Aus den aufgezeigten Sekretionsprofilen ist abzuleiten, dass alle generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen T_H1-Zellen sind.

3.3.4 Das zytotoxische Potential der Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T_H1-Zellen

Das Ziel, möglichst viele Tumorantigen-spezifische IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen hoher Funktionalität (T_{EM}, T_H1-Phänotyp) zu generieren, wurde erfüllt, so dass weitere Analysen durchgeführt werden konnten. In Folgeversuchen wurden die generierten Tumorantigen-spezifischen T-Zellen auf ihr zytotoxisches Potential mittels CD107a-Assays untersucht. Hierbei wurde die Expression der zytotoxischen Marker CD107a und Granzyme B nach einer Restimulation mit dem entsprechenden überlappenden Tumorantigen-Peptidmix im Verhältnis zur Negativkontrolle (MOG) durchflusszytometrisch ermittelt. Beispielhaft ist in Abbildung 11 die durchflusszytometrische Analyse von PRAME (1) gezeigt. Die Anzahl an IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen, die Granzyme B sezernieren, war von Spender zu Spender relativ unterschiedlich (25,15% \pm 10,70). Den höchsten Wert erzielten, nach Abzug der Negativkontrolle (MOG-stimulierte Zellen), die PRAME spezifischen T-Zellen (PRAME (2): 40,31%; PRAME (1): 35,73%; PRAME (3): 19,20%), gefolgt von den ROR1 (15,63%) und MAGE-A3 (14,89%) spezifischen T-Zellen. Die Negativkontrolle von den generierten MAGE-A3 spezifischen T-Zellen war aber mit 26,41% im Vergleich zu den anderen Kontrollen sehr hoch

(MW: 7,23% ± 9,94). Eine weitere Abweichung lag bei den PRAME (1) spezifischen T-Zellen vor: Hier war die Anzahl der Granzyme B⁺ IFN- γ ⁻ CD4⁺ T-Zellen in der Negativkontrolle mit 21,93% im Vergleich sowohl zur PRAME (1) Population (7,19%) als auch zu den anderen Negativkontrollen hoch (MW: 9,90% ± 6,35). Die Anzahl der CD107a⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen war bei den ROR1 spezifischen T-Zellen mit 26,63% am höchsten, gefolgt von PRAME (2) (13,17%), MAGE-A3 (13,00%) und PRAME (1) (10,44%). Die geringste Rate an CD107a⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen wies PRAME (3) mit 5,55% auf.

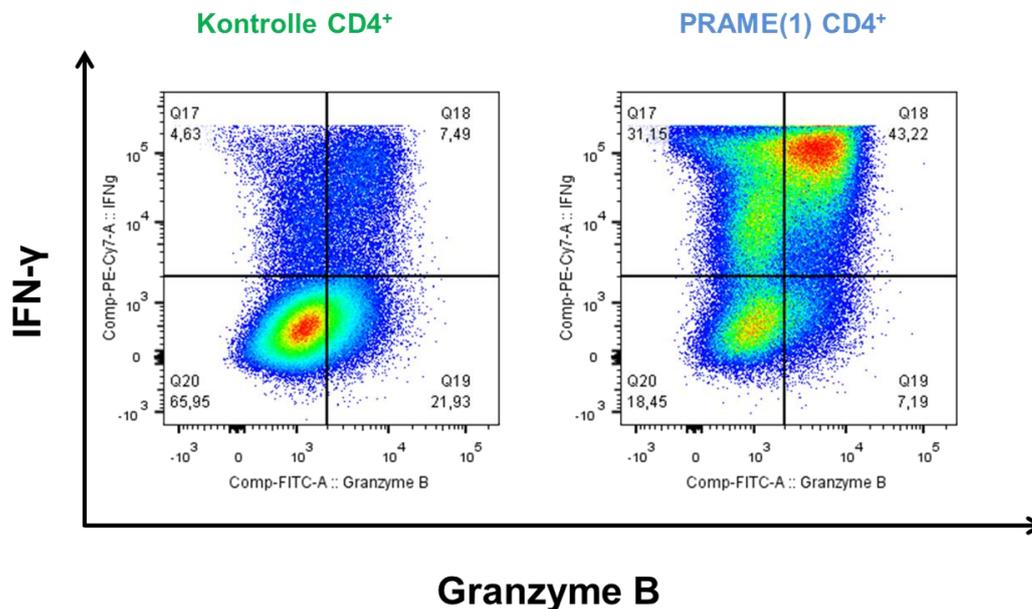


Abbildung 11: Zytotoxisches Potential der generierten PRAME (1) spezifischen CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (Granzyme B; %).

3.4 Tumorantigen-spezifische Proliferation der CD4⁺ T_H1-Zellen

Die Fähigkeit der generierten CD4⁺ T-Zellen zur Proliferation, nach der Restimulation mit DCs und dem entsprechenden überlappenden Peptidmix, wurde mittels sechstägigem CFSE-Assay untersucht. CFSE ist ein intrazellulärer Farbstoff, welcher sich zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen verteilt und durchflusszytometrisch gemessen werden kann. Für die generierten PRAME (2) CD4⁺ T-Zellen konnten keine Proliferationsdaten erhoben werden, da Spenderin 2 nicht mehr zur Blutspende zur Verfügung stand und keine DCs bzw. PBMCs für die Generierung von DCs mehr vorhanden waren. Die Vitalität der Zellen fiel

sehr unterschiedlich aus: MAGE-A3 und PRAME (3) T-Zellen zeigten eine geringe Rate an vitalen Zellen (12,16% und 16,10%), wohingegen PRAME (1) und ROR1 gute Vitalitätsraten aufwiesen (54,24% und 77,87%). Alle untersuchten generierten CD4⁺ T-Zellen zeigten, nach Abzug der Negativkontrolle (MOG-stimulierte T-Zellen), eine gute Fähigkeit zur Proliferation (CFSE⁻; Mittelwert 52,43% ± 19,17). Die Negativkontrollen hatten eine geringe Proliferationsrate, da den Zellen der zum Leben nötige Stimulus durch das Antigen fehlte (Mittelwert: 12,97% ± 5,21; siehe Abbildung 12).

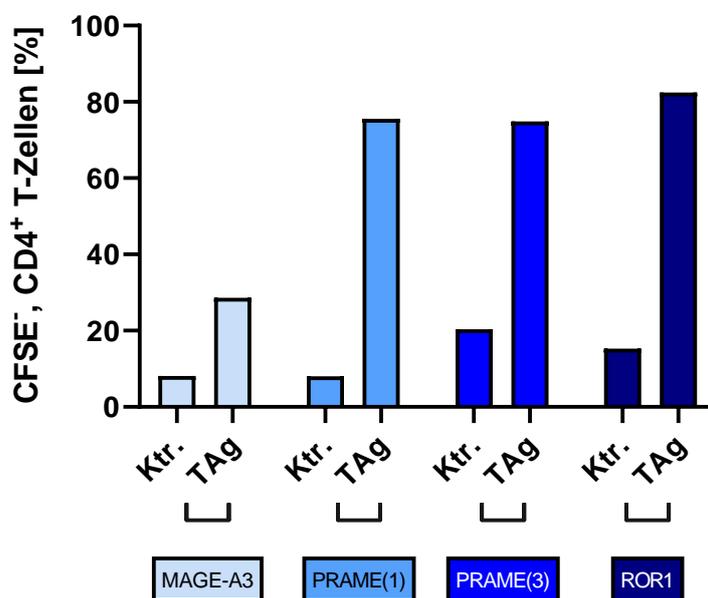


Abbildung 12: Proliferationspotential (CFSE⁻) der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (Ktr.).

Im Allgemeinen hatten die MAGE-A3 spezifischen T-Zellen mit 20,50%, nach Abzug der Negativkontrolle, das geringste Proliferationspotential und die PRAME (1) spezifischen T-Zellen mit 67,55% das beste Proliferationspotential (siehe Abbildung 13 und Tabelle 17). Der Anteil an proliferierenden IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen war mit 2,05% (\pm 0,56%) insgesamt eher gering.

	Vitalität	CFSE ⁻	CFSE ⁻ /IFN- γ ⁺
MAGE-A3	12,16	20,50	2,97
PRAME (1)	54,24	67,55	1,46
PRAME (3)	16,1	54,50	1,79
ROR1	77,87	67,16	1,98

Tabelle 17: Vitalität, Proliferationspotential (CFSE⁻) und IFN- γ ⁺ Proliferationspotential der Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in Prozent.

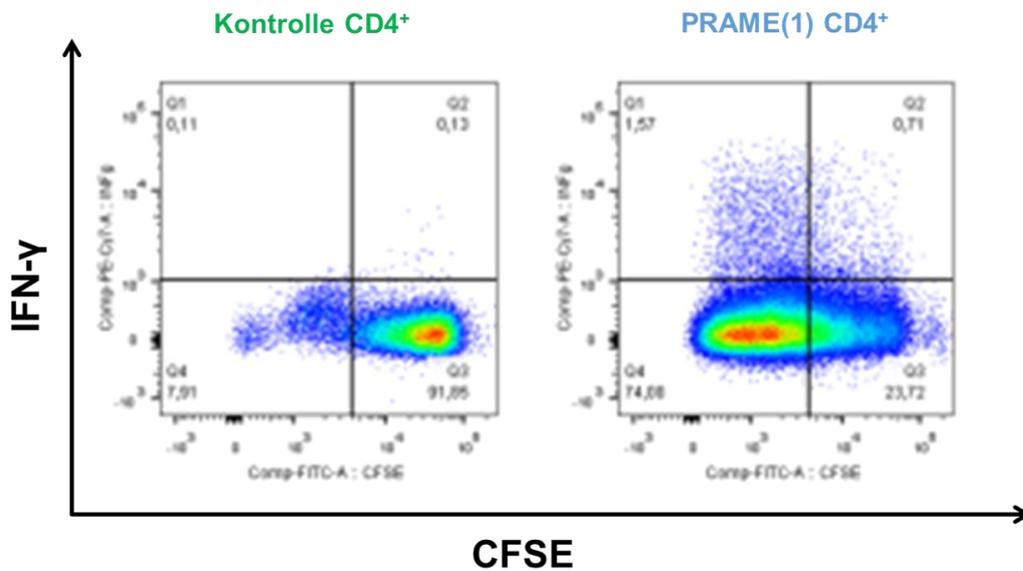


Abbildung 13: Proliferationspotential (CFSE⁻) der PRAME (1) spezifischen CD4⁺ T-Zellen und deren IFN- γ Sekretion im Vergleich zur Negativkontrolle (MOG).

Eine Besonderheit lag hingegen bei den PRAME (3) spezifischen T-Zellen vor. Hier war die Vitalität mit 16,10%, wie auch der Anteil an CD4⁺ T-Zellen (60,81%; Mittelwert der anderen: 92,03%) sehr gering, während der Anteil an CD3⁺/CD56⁺/CD8⁺ T-Zellen mit 26,31% sehr hoch war (am Ende der Expansion ähnlich hohe Anzahl an CD8⁺ Zellen mit 23,51%). Diese Zellen proliferierten nach einer Präsensibilisierung mit DCs und PRAME-überlappenden Peptidmischen etwa im selben Maße wie die CD4⁺ T-Zellen (53,03%, nach Abzug der Negativkontrolle; CD4⁺ T-Zellen: 54,50%). Der Anteil an CFSE⁻ IFN- γ ⁺ Zellen war im Vergleich zu den CD4⁺ T-Zellen, ebenfalls nach Abzug der Negativkontrolle, geringer (0,85% verglichen mit 1,79% bei den CD4⁺ T-Zellen).

3.5 Einfluss von Immun-Checkpoint-Inhibitoren auf die Tumorantigen-spezifischen T-Zellen

Die Inhibierung von Immun-Checkpoints führt gemäß aktuellen Forschungsergebnissen zu einer langanhaltenderen und effizienteren T-Zellaktivität. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie beispielsweise PD1, B7-H3, LAG3 und TIM3 auf die generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im CD107a-Assay (zytotoxisches Potential) sowie im Proliferationsassay (CFSE-Assay) untersucht.

Im CD107a-Assay wurde der Einfluss des Immun-Checkpoint-Inhibitors PD1 auf das zytotoxische Potential der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, nach Abzug der Negativkontrolle, untersucht (siehe Abbildung 14). Nach erneuter Restimulation mit den überlappenden Peptidmischen war ein Anstieg der Granzyme B⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen, wie auch der Population in der Negativkontrolle zu erkennen. Somit ergab sich, nach Abzug der Negativkontrolle, nur eine kleine Steigerung des zytotoxischen Potentials (MW: +1,22% \pm 3,06) in Bezug auf die Granzyme B Sekretion. Die Steigerung der Granzyme B⁺ IFN- γ ⁺ Sekretion der unbehandelten zu den mit PD1 blockierenden Zellen war aber, mit einem p-Wert von 0,89, nicht signifikant. Eine Ausnahme bildeten die MAGE-A3 spezifischen T-Zellen. Bei ihnen wurde ein verringertes zytotoxisches Potential (-4,79%), nach Abzug der Negativkontrolle, erzielt.

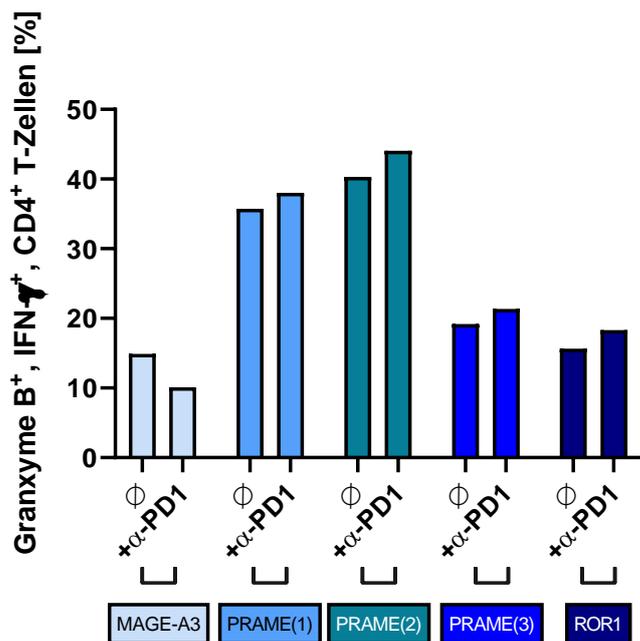


Abbildung 14: Effekt der Immun-Checkpoint-Inhibition mittels PD1 auf das zytotoxische Potential der CD4⁺ T-Zellen, verglichen mit dem zytotoxischen Potential ohne Zugabe des blockierenden Antikörpers PD1 (∅).

In Bezug auf die CD107a⁺ IFN-γ⁺ CD4⁺ T-Zellen war die Wirkung des blockierenden Antikörpers PD1 noch schwächer. Hier konnte, außer bei ROR1 spezifischen T-Zellen (+6,30%), ebenfalls aufgrund eines gleichzeitigen Anstieges der Negativkontrolle, keine signifikante Zunahme des zytotoxischen Potentials nachgewiesen werden (p = 0,88).

Zusätzlich wurde im CD107a-Assay teilweise die Wirkung der Immun-Checkpoint-Inhibitoren B7-H3, LAG3 und TIM3 sowie Kombinationen davon untersucht. Nicht berücksichtigt, da nicht durchgeführt, wurden in diesen Versuchen die generierten PRAME (1) und ROR1 CD4⁺ T-Zellen. Die blockierenden Antikörper erhöhten die Rate an Granzyme B⁺ IFN-γ⁺ CD4⁺ T-Zellen in den MAGE-A3 spezifischen T-Zellen nach Abzug der Negativkontrolle weder einzeln appliziert (LAG3), noch in Kombination (PD1+LAG3). Bei den PRAME (2) spezifischen T-Zellen konnte durch LAG3 (+2,29%) und die Kombination von PD1 und LAG3 (+1,83%) sowie PD1 und TIM3 (+6,49%) eine Steigerung der Granzyme B⁺ IFN-γ⁺ CD4⁺ T-Zellen erreicht werden. Bei den PRAME (3) spezifischen T-Zellen war nur die Kombination von PD1 und LAG3 zur Steigerung der Granzyme B⁺ IFN-γ⁺ CD4⁺ T-Zellen in der Lage (+2,41%). Die Prozentzahlen der CD107a⁺ IFN-γ⁺ CD4⁺ T-Zellen konnten nur im Falle von

PRAME (2) spezifischen T-Zellen durch den Einsatz von TIM3 (+1,71%) und PD1 in Kombination mit TIM3 (+1,21%) leicht gesteigert werden. Somit ist zusammenfassend eine geringe bzw. keine Wirkung der getesteten Immun-Checkpoint-Inhibitoren PD1, B7-H3, LAG3 und TIM3 auf das zytolytische Potential der generierten CD4⁺ T-Zellen zu erkennen.

Im CFSE-Assay wurde untersucht, ob die Zugabe des Checkpoint-Inhibitors PD1 zu einer gesteigerten Proliferation oder/und einer gesteigerten proliferationsabhängigen IFN- γ Sekretion (CFSE⁻ IFN- γ ⁺) führt. Es kam zu einer gesteigerten Proliferation der Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen und gleichzeitig zu einer gesteigerten Proliferation der Negativkontrolle (MOG-stimulierte Zellen). Dadurch konnte, nach Abzug der Negativkontrolle, kein signifikanter Effekt der Immun-Checkpoint-Blockade hinsichtlich der Proliferation (CFSE⁻) und der IFN- γ abhängigen Proliferation nachgewiesen werden (siehe Abbildung 15).

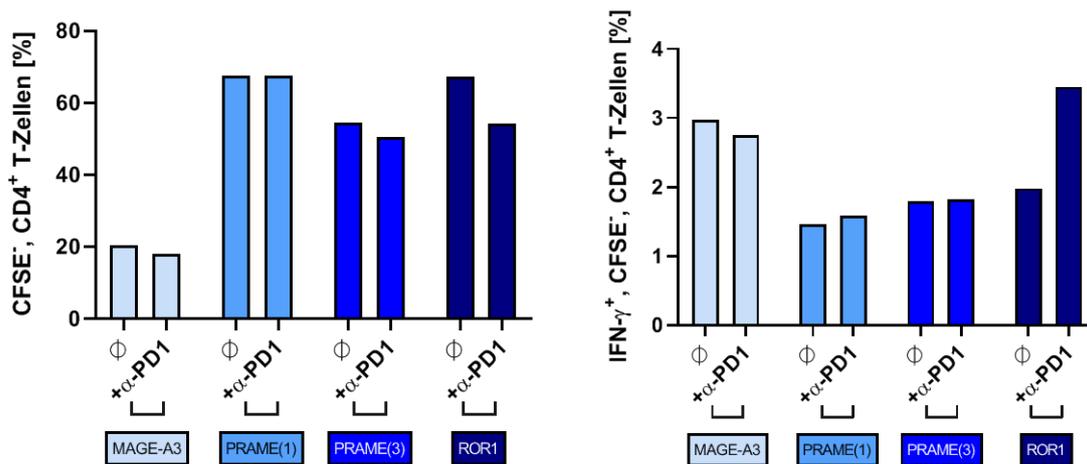


Abbildung 15: Proliferationspotential (CFSE⁻) und IFN- γ abhängige Proliferation (IFN- γ ⁺/CFSE⁻) mit und ohne Immun-Checkpoint-Inhibition (PD1) in Prozent.

3.6 Expression der Immun-Checkpoints der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen

Die Expression der Immun-Checkpoints PD1, LAG3, TIM3 und B7-H3 der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch im CFSE-Assay untersucht. Im CD107a-Assay wurde, bis auf B7-H3, die Expression der gleichen Immun-Checkpoints analysiert. Im CFSE-Assay wurden die PRAME (2) spezifischen CD4⁺ T-Zellen nicht

untersucht, da keine DCs der Spenderin mehr vorhanden waren, und Spenderin 2 nicht mehr zur Verfügung stand.

Im CD107a-Assay wurden die Tumorantigen-spezifischen T-Zellen mit DCs und dem entsprechenden überlappenden Peptidmix einmalig restimuliert. Die Restimulation und anschließende vierstündige Inkubation ergaben die in Tabelle 18 gezeigten Immun-Checkpoint-Expressionen in Prozent. In Abhängigkeit zur Negativkontrolle (MOG-restimuliert) wiesen, nach Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen sortiert, folgende Immun-Checkpoints eine Hochregulation der Expression auf: MAGE-A3: PD1, LAG3 und TIM3; PRAME (1): keine Hochregulation zu detektieren; PRAME (2): PD1 und LAG3; PRAME (3) und ROR1: LAG3. Es konnte nicht für alle drei Immun-Checkpoints eine Hochregulation gemessen werden, da teilweise die Expression der Immun-Checkpoints der Negativkontrolle (MOG-restimulierte Zellen) ebenfalls respektive stärker anstieg als die der Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Der Mittelwert der Expression lag für PD1 bei 42,66% ($\pm 19,96$), für LAG3 bei 12,70% ($\pm 9,56$) und für TIM3 bei 42,40% ($\pm 17,80$). Um eine statistische Aussage machen zu können, müssten Replikate für die jeweiligen Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen angefertigt werden.

	PD1	LAG3	TIM3
MAGE-A3	69,57	27,11	70,83
PRAME (1)	60,64	20,08	49,35
PRAME (2)	27,79	6,47	41,32
PRAME (3)	15,98	0,74	16,93
ROR1	39,34	9,12	33,57

Tabelle 18: Expression der Immun-Checkpoints PD1, LAG3 und TIM3 der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im CD107a-Assay in Prozent.

Im CFSE-Assay hingegen wurden die Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zweimalig, an Tag 0 und Tag 6, restimuliert. Daraus ergaben sich im CFSE-Assay, mit wenigen Ausnahmen, höhere Expressionsraten der Immun-Checkpoints als im CD107a-Assay. Zu einer niedrigeren Expression kam es, verglichen mit dem CD107a-Assay, bei den MAGE-A3 spezifischen CD4⁺ T-

Zellen für PD1 und TIM3, sowie für PD1 bei den PRAME (1) spezifischen CD4⁺ T-Zellen.

	PD1	LAG3	TIM3	B7-H3
MAGE-A3	52,45	58,79	68,48	22,35
PRAME (1)	54,02	54,92	73,50	42,66
PRAME (3)	71,77	21,54	52,79	27,05
ROR1	79,09	76,54	73,14	42,96

Tabelle 19: Expression der Immun-Checkpoints PD1, LAG3, TIM3 und B7-H3 der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im CFSE-Assay in Prozent.

Im CFSE-Assay war aber, in Abhängigkeit zur Negativkontrolle (MOG-restimulierte T-Zellen), in allen Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen eine vermehrte Expression der Immun-Checkpoints PD1, LAG3 und TIM3 zu messen. Gleiches gilt für die B7-H3-Expression. Eine Ausnahme bildeten allerdings die MAGE-A3 spezifischen T-Zellen, bei denen es, im Vergleich zur Negativkontrolle, zu einer verminderten Expression von B7-H3 kam. Im Falle der PD1 und LAG3 Expression konnte, im Vergleich zur Negativkontrolle, sogar eine statistisch signifikante Expressionssteigerung nachgewiesen werden ($p = 0,0246$ bzw. $0,0473$). Die Expressionsraten der Immun-Checkpoints PD1, LAG3, TIM3 und B7-H3 sind in Tabelle 19 aufgeführt. Der Vergleich zur Negativkontrolle (Ktr.) ist in Abbildung 16 zu sehen. Es wird jeweils die Expression des Immun-Checkpoints der Kontrolle (Ktr. = MOG-restimulierte Zellen) und der Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in Prozent dargestellt.

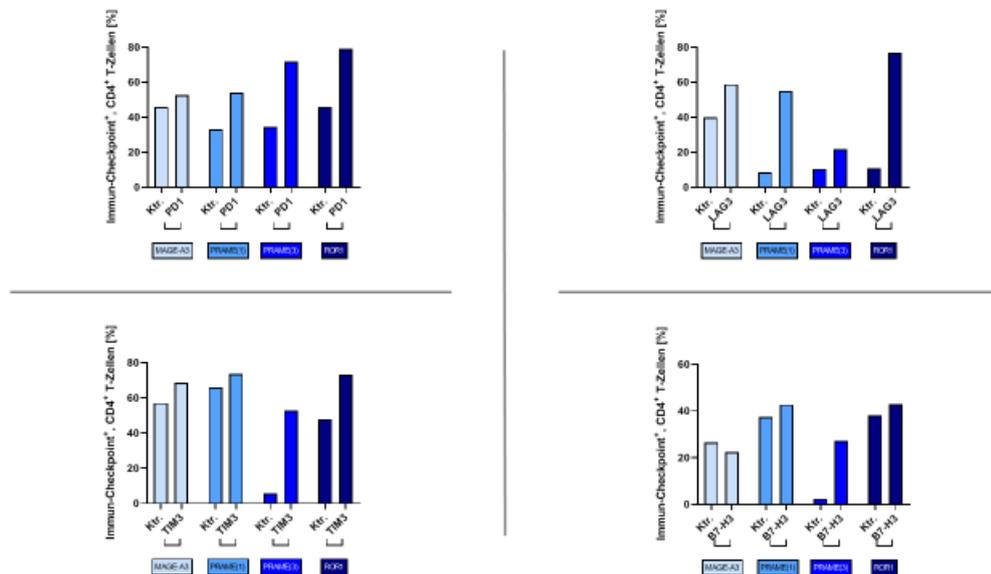


Abbildung 16: Expression der Immun-Checkpoints PD1, LAG3, TIM3 und B7-H3 der Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle im CFSE-Assay in Prozent.

3.7 Wirkungsweise der Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen auf Tumorzelllinien

3.7.1 Induktion eines Wachstumsstillstandes durch Überstände von Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in WM115

Im nächsten Schritt wurden die generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen auf die Fähigkeit zur Induktion von Seneszenz, einem Wachstumsstillstand, über die Sekretion von IFN- γ und TNF- α untersucht. Hierfür wurde die Melanomzelllinie WM115 verwendet, da bekannt ist, dass bei dieser Zelllinie Seneszenz durch die beiden Zytokine IFN- γ und TNF- α induziert werden kann (Braumuller, 2013). Zur Analyse der Seneszenzinduktion wurden BrdU-Assays mit Überständen der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen durchgeführt.

Normalerweise wird die Tumorzelllinie WM115 in RPMI Medium mit 20% FCS kultiviert, die CD4⁺ T-Zellen aber in AB-Medium, weswegen eine Lösung bezüglich der Generierung von Überständen bzw. der Kultivierung während des

BrdU-Assays gefunden werden musste. Aus diesem Grund wurden die Überstände mit AB-Medium sowie RPMI-Medium mit 20% FCS generiert. Die Vitalität der PRAME (3) spezifischen CD4⁺ T-Zellen und deren IFN- γ -Sekretion in AB-Medium und RPMI Medium mit 20% FCS wurde nach 4 Stunden Inkubation verglichen. Hierbei war die Vitalität bei den PRAME (3) spezifischen CD4⁺ T-Zellen, welche in AB-Medium kultiviert worden waren, besser (65% zu 49% mit RPMI-Medium mit 20%FCS). Die Anzahl an IFN- γ sezernierender CD4⁺ T-Zellen war aber mit 54% in AB-Medium und 59% in RPMI-Medium mit 20% FCS annähernd gleich. Die von den PRAME (3) spezifischen CD4⁺ T-Zellen generierten Überstände (AB-Medium und RPMI-Medium + 20% FCS) wurden, zum Vergleich der Wirkung der Medien, im BrdU-Assay auf die Tumorzelllinie WM115 gegeben. WM115 Zellen wurden hierfür im jeweils entsprechenden Medium kultiviert. Ein besseres Wachstum war mit dem normalen Medium, also RPMI Medium mit 20% FCS, zu konstatieren. In Abbildung 17 ist das Ergebnis des Mediumversuches dargestellt. Die Mediumkontrolle (Medium-Ktr.: ohne Zytokine) und die Negativkontrolle (Überstände von MOG-restimulierten T-Zellen) zeigten fast identische Ergebnisse wie die Positivkontrolle (IFN- γ und TNF- α) und die PRAME (3) spezifischen Überstände. Die PRAME (3) spezifischen Überstände und die Positivkontrolle induzierten einen Wachstumsstillstand. Für die PRAME (3) spezifischen Überstände fiel der Anteil der S-Phase (lila) höher in AB-Medium aus, so dass hier eine schwächere Wirkung im Vergleich zum RPMI Medium mit 20% FCS erzielt wurde. Des Weiteren ist ein Unterschied bei den verwendeten Medien zu sehen: In der Positivkontrolle als auch den PRAME (3) spezifischen Überständen sind bei einer Behandlung in AB-Medium weitaus mehr apoptotische Zellen (blau) zu verzeichnen (Positivkontrolle 45% und PRAME (3) Überstände 38%). Bei einer Kultivierung in RPMI-Medium mit 20% FCS liegt der Anteil für die Positivkontrolle und die PRAME (3) spezifischen Überstände bei 9%. Neben den apoptotischen Zellen sind noch die Zellen dargestellt, welche sich in der G0/G1-Phase (rot), G3/M-Phase (grün) oder der S-Phase befinden. Bei der Testung der ROR1 spezifischen Überstände mit der in beiden Medien kultivierten Melanomzelllinie WM115 konnten sehr ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Die Ergebnisse der

Mediumkontrolle und der Negativkontrolle (MOG-stimulierte Überstände), sowie der Positivkontrolle und der ROR1 spezifischen Überstände waren erneut annähernd identisch. Verglichen mit der Mediumkontrolle war bei den MOG-stimulierten Überständen jedoch ein geringerer Prozentsatz der Zellen in der S-Phase. Beim BrdU-Assay in AB-Medium war stattdessen in der Negativkontrolle ein erhöhter Prozentsatz apoptotischer Zellen zu finden (12% zu 2% in der Mediumkontrolle; S-Phase: Negativkontrolle -7% verglichen mit der Mediumkontrolle). In der Kultur in RPMI-Medium mit 20% FCS waren, verglichen mit RPMI-Medium mit 20% FCS, vermehrt apoptotische Zellen gefunden worden (ROR1: 51% zu 18%; Positivkontrolle: 39% zu 12%).

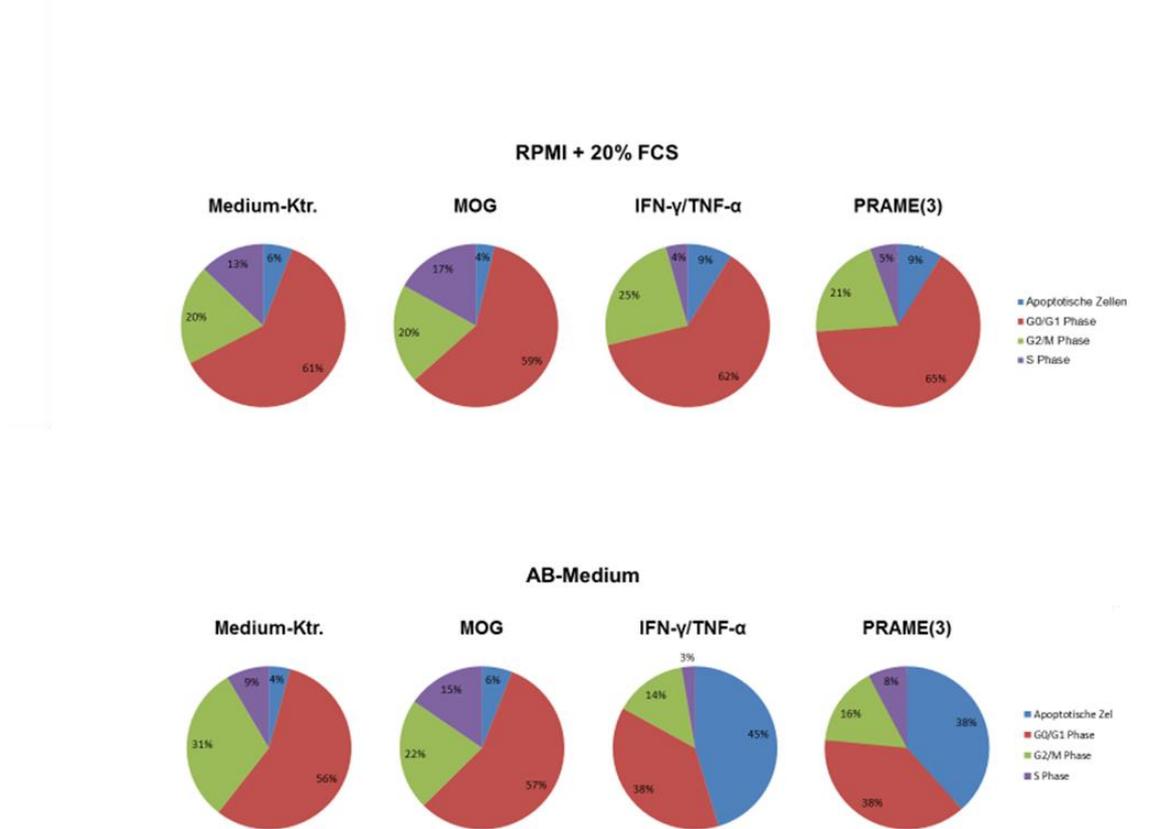


Abbildung 17: Induktion von Seneszenz in WM115 mit PRAME (3) spezifischen Überständen (AB-Medium und RPMI+20% FCS).

Aus den beschriebenen Ergebnissen wurde abgeleitet, dass eine Kultur im üblichen Medium der Melanomzelllinie WM115 (RPMI-Medium mit 20% FCS) die bessere Lösung ist, da bei den CD4⁺ T-Zellen weniger Proliferationsschwierigkeiten vorhanden sind als bei den Tumorzellen. Daher wurden die weiteren BrdU-Assays mit der Melanomzelllinie WM115 in dem Kulturmedium RPMI mit 20% FCS angefertigt. Eine Ausnahme bildeten die PRAME (2) spezifischen Überstände. Diese wurden bereits mit AB-Medium hergestellt und es fehlten die für einen erneuten BrdU-Assay nötigen DCs, weswegen hierfür die Zelllinie WM115 in AB-Medium kultiviert worden ist. Für die Überstände der Tumorantigen-spezifischen MAGE-A3 und PRAME (1) CD4⁺ T-Zellen wurde das RPMI-Medium mit 20% FCS verwendet. Beispielhaft für alle durchgeführten BrdU-Assays ist in Abbildung 18 eine durchflusszytometrische Analyse der MAGE-A3 Überstände gezeigt.

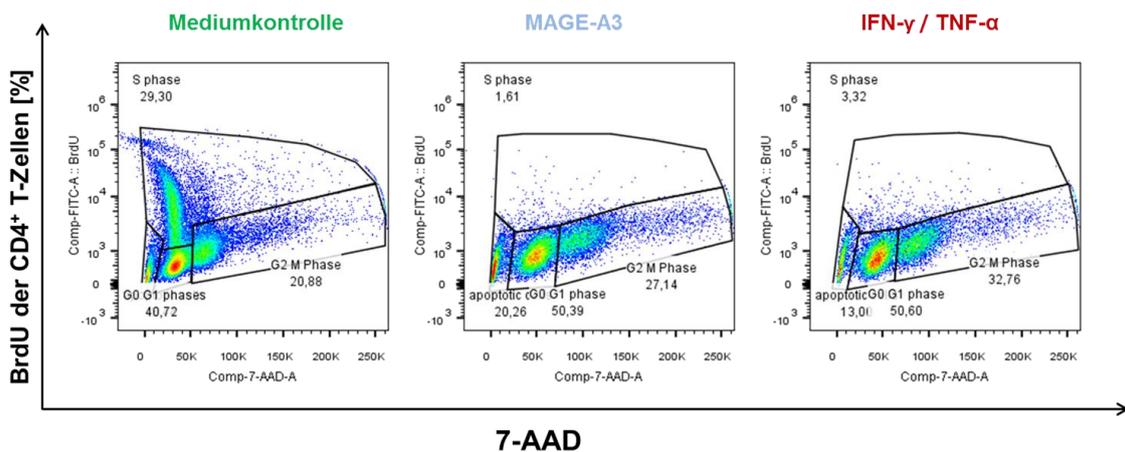


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse des BrdU-Assays mit Überständen der MAGE-A3 spezifischen CD4⁺ T-Zellen.

Unabhängig vom Medium konnte bei allen BrdU-Assays eine Induktion von Seneszenz festgestellt werden. Gleichzeitig war, außer bei den Versuchen mit PRAME (3) spezifischen Überständen und nur gering ausgeprägt bei den ROR1 spezifischen Überständen, eine verringerte Proliferation (S-Phase) in der Negativkontrolle (MOG-stimulierte Überstände) und somit eine Seneszenzinduktion zu sehen. In der Mediumkontrolle war dies nicht zu beobachten, hier war stets eine höhere Proliferation zu sehen (18% \pm 9). Der Mittelwert der S-Phase (MAGE-A3, PRAME (1), PRAME (2) und ROR1) lag bei den Negativkontrollen bei 3% (\pm 2,4) wohingegen die Tumorantigen-Überstände

nur 1% ($\pm 0,5$) ergaben. Der Unterschied der Proliferation zwischen Medium- und Negativkontrolle ist mit einem p-Wert von 0,055 nicht signifikant. Ebenso ist der Unterschied der Negativkontrolle zu Tumorantigen-spezifischen Überständen nicht signifikant ($p = 0,276$). Um den Effekt der Negativkontrollen zu minimieren, wurden 1:100 Verdünnungen der Negativkontrollen und der Tumorantigen-spezifischen Überstände hergestellt. Hierbei zeigte sich, dass die Proliferation der Negativkontrollen ($18\% \pm 7$) in etwa der der Mediumkontrolle entspricht. Doch auch die Proliferation der mit Tumorantigen-spezifischen Überständen behandelten Tumorzellen war durch die Verdünnung erhöht ($14\% \pm 8$). Infolgedessen näherte sich die Proliferation der Tumorzellen nach der Behandlung mit Tumorantigen-spezifischen Überständen der Mediumkontrolle anstatt weiterhin Resultate entsprechend der Positivkontrolle ($2\% \pm 1$) zu erzielen. Die Ergebnisse sind stellvertretend für die Tumorzelllinie WM115 nach der Behandlung mit PRAME (1) spezifischen Überständen in Abbildung 19 veranschaulicht.

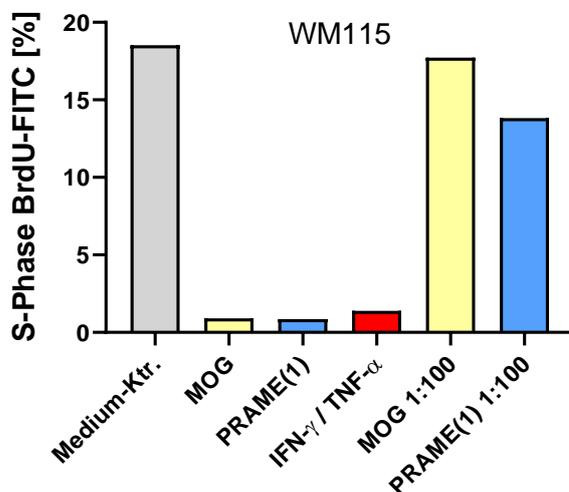


Abbildung 19: Seneszenzinduktion in der Melanomzelllinie WM115 durch PRAME (1) spezifische Überstände.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass alle Überstände der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in der Lage waren, in der Zelllinie WM115 Seneszenz zu induzieren. Gleiches gilt für die MOG-stimulierten Überstände.

3.7.2 Permanente Induktion von Seneszenz durch Überstände von Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen

Nachdem die Sekretion von IFN- γ und TNF- α der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zur Induktion von Seneszenz geführt hatte, war im nächsten Schritt zu klären, ob der Wachstumsstillstand von Dauer sein würde. Hierfür wurden die Tumorzellen der Melanomzelllinie WM115 nach dem BrdU-Assay mit PBS gewaschen, so dass die Zytokine nicht weiter auf die Tumorzellen wirken konnten, und erneut ausgesät (RPMI-Medium mit 20% FCS). Als Negativkontrolle wurden die Tumorzellen des BrdU-Assays, welche mit MOG-Überständen behandelt worden waren, verwendet. Die Anzahl vitaler Tumorzellen wurde zu vier Zeitpunkten bestimmt: Zu Beginn des BrdU-Assays, nach Abschluss der Behandlung mit den Überständen (Ende des BrdU-Assays), sowie bei zwei Zellpassagen nach dem Assay (d10 und d15). In dieser Zeit war es den mit MOG-Überständen behandelten Kontrollzellen möglich zu proliferieren, wohingegen die Tumorzellen, welche mit Tumorantigen-spezifischen Überständen behandelt worden waren, keine bzw. sehr geringe Proliferation zeigten (siehe Abbildung 20). Dieser Versuch wurde nur für die Melanomzelllinie WM115 mit den dargestellten PRAME (1) und (3), sowie den ROR1 Überständen durchgeführt.

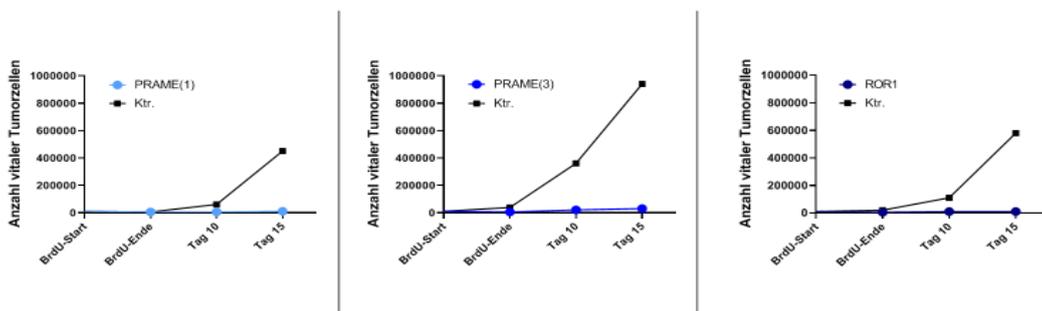


Abbildung 20: Anzahl vitaler Tumorzellen (WM115) zu Beginn und am Ende des BrdU-Assays, sowie bei zwei Zellpassagen nach Abschluss des Assays (d10 und d15).

3.7.3 Wirkung von IFN- γ und TNF- α auf das Ewing Sarkom RDES

Um die Wirkung von IFN- γ und TNF- α auf das Ewing Sarkom RDES zu ermitteln, wurde ein weiterer BrdU-Assay durchgeführt. Dieser erfolgte nur mit einer Medium- und Positivkontrolle, also ohne Tumorantigen-spezifische Überstände, da im ersten Schritt die Fähigkeit zur Seneszenz überprüft werden sollte. Zu Beginn des Protokolls wurden pro Well (48 Well-Platte) 5.000 Zellen RDES ausgesät. Nach der 24-stündigen Adhärenzphase wurde in den Mediumkontrollen nur das Medium gewechselt, wohingegen in der Positivkontrolle IFN- γ und TNF- α hinzugegeben wurde. Nach 96 Stunden wurde den Zellen BrdU-FITC zugegeben und für einen weiteren Tag inkubiert, bevor sie durchflusszytometrisch analysiert wurden. Beim Ewing Sarkom RDES rief die Behandlung mit IFN- γ und TNF- α keine Induktion von Seneszenz hervor (siehe Abbildung 21). Der prozentuale Anteil der proliferierenden Zellen war in der Positivkontrolle mit 59,33% höher als in der Mediumkontrolle (38,51%). Aus diesem Grund wurden keine weiterführenden Versuche mit spezifischen Überständen durchgeführt.

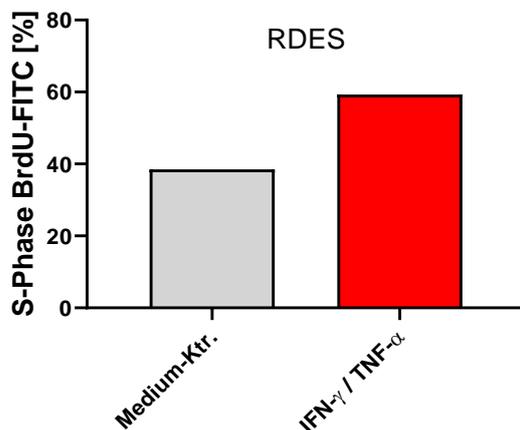


Abbildung 21: Anhaltende Proliferation des Ewing Sarkoms RDES trotz einer Behandlung mit IFN- γ und TNF- α .

4 Diskussion

Sarkome sind eine heterogene Gruppe von malignen Tumoren mesenchymalen Ursprungs und machen etwa 1% aller adulten und 20% aller soliden pädiatrischen Krebsarten aus (Burningham et al., 2012). Liegt ein metastasiertes Sarkom oder ein Rezidiv vor, sind die Behandlungsmöglichkeiten limitiert, da die Malignome auf Standardtherapien meist nicht (mehr) sensitiv reagieren, wodurch die Heilungschancen drastisch sinken (Veenstra et al., 2018). Daher ist es nötig, neue Wege in der Behandlung von metastasierten Sarkomen oder Rezidiven zu beschreiten. Eine Möglichkeit bietet die epigenetische Modulation von Tumorantigenen oder den spezifischeren Cancer-Testis-Antigenen. Maligne Tumoren vermindern ihre Immunogenität teilweise durch die Herabregulierung der Expression von Tumorantigenen. Dies führt dazu, dass maligne Zellen durch das Immunsystem schlechter erkannt und dadurch weniger stark bekämpft werden (Wolf and Rotter, 1985, Ploegh, 1998, Ayyoub et al., 2001). Dies kann durch den Einsatz von demethylierenden Substanzen, wie beispielweise Decitabine, einem DNA-Methyltransferase-Inhibitor, verhindert werden. Decitabine ist durch Blockierung der DNA-Methylierung in der Lage, eine Hochregulation oder *de novo* Expression von CTA zu erzielen (Sigalotti et al., 2005, Coulie et al., 2014). Zusätzlich führen DNA-Methyltransferase-Inhibitoren zu einer gesteigerten Funktion von Immunzellen, so dass dadurch das Malignom nochmal besser bekämpft werden kann (Mohammad et al., 2019).

Neben der Verbesserung der Expression der Tumorantigene kann auch das Immunsystem beeinflusst bzw. modifiziert werden, um Krebszellen besser zu erkennen. Eine Möglichkeit ist der adoptive T-Zelltransfer, bei dem spezifische, gegen das Antigen gerichtete T-Zellen *in vitro* zuerst selektiert und anschließend expandiert werden, bevor diese dem erkrankten Patient verabreicht werden (Kalos and June, 2013). Lange Zeit wurde hierbei der Fokus auf CD8⁺ T-Zellen gelegt, welche im Kontext hämatologischen Erkrankungen erforscht worden sind (Mohamed et al., 2016). Seit einigen Jahren werden zunehmend CD4⁺ T-Zellen eingesetzt, da diese zusätzlich in der Lage sind, Seneszenz in manchen Tumorzelllinien zu induzieren (Braumuller et al., 2013, Kayser et al., 2015). Aus

diesem Grund und der Möglichkeit diese Zellen unter GMP-Bedingungen (Good Manufacturing Practice) herstellen zu können, wurde in dieser Arbeit mit CD4⁺ T-Zellen gearbeitet. Zusätzlich wurden Immun-Checkpoint-Inhibitoren eingesetzt, da die Blockierung der inhibitorischen Signalwege zu einer langanhaltenderen und effizienteren T-Zell-Aktivität führen sollen (Pardoll, 2012, Topalian, 2017).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die epigenetische Modulation von Tumorzelllinien zu einer *de novo* Expression oder Hochregulation von Tumorantigenen führt. Gleichzeitig wurde versucht Tumorantigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen zu selektionieren und anschließend zu expandieren. Diese Zellen wurden daraufhin auf ihren Phänotyp, ihr zytotoxisches und Proliferationspotential untersucht. Im nächsten Schritt wurde ermittelt, ob der Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren zu einer Steigerung des zytotoxischen oder Proliferationspotentials führt und ob die spezifischen Tumorantigen CD4⁺ T-Zellen Immun-Checkpoints exprimieren.

Im letzten Schritt wurde getestet, ob die spezifischen CD4⁺ T-Zellen dazu in der Lage sind, Seneszenz in einer Melanomzelllinie, bei welcher bekannt ist, dass sie in Seneszenz gehen kann, zu induzieren. Außerdem wurde noch eine der vier Sarkomzelllinie auf ihre Fähigkeit in Seneszenz zu gehen untersucht.

4.1 Tumorantigen-Expression und deren epigenetische Modulation

Tumorantigene werden auf der Oberfläche von malignen Zellen exprimiert oder liegen im extrazellulären Raum um Malignome vor und können eine Immunantwort bei dem betroffenen Patient auslösen (Steinman, 1991, Meeusen et al., 2017). Viele Tumoren sind jedoch dazu in der Lage ihre Immunogenität durch Methylierung herabzusetzen, da auf diese Weise die Expression von Tumorantigenen vermindert wird (Ploegh, 1998). Decitabine, ein DNA-Methyltransferase-Inhibitor, kann kovalent an die DNA binden und dadurch die verminderte Expression von Tumorantigenen durch Methylierung blockieren (Bao et al., 2011). Der Einsatz von Decitabine kann sogar zu einer *de novo* Expression oder Hochregulation von Tumorantigenen, zum Beispiel MAGE-A3, führen, wie von Krishnadas et al. für Ewing, Osteo- und Rhabdomyosarkome

beschrieben (Krishnadas et al., 2014). Die vorliegende Arbeit knüpft an diese Ergebnisse an. Um eine *de novo* Expression oder Hochregulation von Tumorantigenen nachzuweisen, wurden die Ergebnisse der quantitative real-time PCRs der unbehandelten und der fünf Tage mit Decitabine behandelten Ewing und Osteosarkomzelllinien (A673, RDES, SaOS und U2OS) verglichen. Zusätzlich wurden als Referenzzellen deren Vorläuferzellen, mesenchymalen Stammzellen und Skelettmuskelzellen, mit und ohne Decitabinbehandlung verglichen.

Die Vorläuferzellen zeigten unbehandelt keine Expression von Cancer-Testis-Antigenen. Eine fünftägige Behandlung mit Decitabine rief eine sehr schwache *de novo* Expression (Ct-Werte > 39) der untersuchten Cancer-Testis-Antigene MAGE-A1, MAGE-A3, NY-ESO-1 und PRAME hervor. Dies lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei Skelettmuskelzellen eigentlich um Myoblasten handelt, welche, wie mesenchymale Stammzellen, noch nicht ausdifferenziert sind. Cancer-Testis-Antigene spielen in der Entwicklung von Stammzellen eine wichtige Rolle, so dass manche CTA wie zum Beispiel MAGE-1, NY-ESO-1 und SSX von Stammzellen des Knochenmarks, sowie fetalen und adulten MSCs exprimiert werden (Cronwright et al., 2005, Costa et al., 2007) bzw. sich die Expression durch eine Behandlung mit Decitabine induzieren lässt.

Die Ewing Sarkomzelllinien A673 und RDES zeigten in fünf unabhängigen qRT-PCRs mit Triplikaten für alle vier CTA (MAGE-A1, MAGE-A3, NY-ESO-1 und PRAME) eine Hochregulation der Expression. Eine Ausnahme bildete die Tumorzelllinie RDES für das CTA NY-ESO-1: Hier führte die Behandlung mit Decitabine zu einer *de novo* Expression. Bei den Osteosarkomzelllinien SaOS und U2OS kam es durch die Behandlung mit Decitabine nur für das CTA NY-ESO-1 und für die Zelllinie U2OS zusätzlich für das CTA MAGE-A3 zu einer Hochregulation der Expression. Krishnadas et al. konnten nach fünftägiger Behandlung mit 1µM Decitabinlösung über qRT-PCRs für die Osteosarkomzelllinie SaOS ebenfalls keine Hochregulation der CTA MAGE-A1 und MAGE-A3 nachweisen, wodurch Teile der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Krishnadas et al., 2014).

Neben der Analyse mittels qRT-PCR wurden diverse Zelllinien durchflusszytometrisch auf die Expression des Tumorantigens ROR1 und des Membranproteins B7-H3 untersucht. Eine ROR1-Expression konnte bei allen untersuchten Ewing und Osteosarkomzelllinien (A673, RDES, SaOS, U2OS), Rhabdomyosarkomzelllinien (RH30, RD, SRH), sowie Melanomzelllinien (EST094, SBCL2, SK-Mel28, WM115) in unterschiedlicher Stärke nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit einigen Untersuchungen, welche eine Expression von ROR1 in diversen Tumorentitäten, unter anderem Ewing Sarkomen, wie auch Normalgeweben nachweisen konnten (Hojjat-Farsangi et al., 2014, Potratz et al., 2016, Balakrishnan et al., 2017).

Bezüglich der Expression von B7-H3 wurden neben den Ewing und Osteosarkomzelllinien noch vier Rhabdomyosarkomzelllinien (ZF, RH30, RD und SRH) sowie drei Melanomzelllinien (WM115, WM853 und WM1205) untersucht. Hier waren ebenfalls alle Zelllinien positiv. Eine Überexpression von B7-H3 konnte unter anderem für Osteosarkome nachgewiesen werden und wird in der Literatur mit einer frühen Metastasierung bzw. allgemein schlechterem Überleben assoziiert (Wang et al., 2013, Topalian et al., 2015).

Auf Basis dieser Ergebnisse sollten, für eine Aussage über die Stärke der Expression von B7-H3, ROR1 und der CTA der fehlenden Zelllinien im Verhältnis zu den entsprechenden Vorläuferzellen noch quantitative real-time PCRs durchgeführt werden.

4.2 Generierung von Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T_H1 Zellen und deren zytotoxisches Potential

Der adoptive T-Zelltransfer ist ein vielversprechender Therapieansatz zur Behandlung von metastasierten Malignomen oder Rezidiven (Restifo et al., 2012). Der Einsatz von T-Zellen gegen spezifische, auf der Oberfläche der Neoplasie vorkommende Antigene, wie zum Beispiel Cancer-Testis-Antigene, hat sich als relativ wirkungsvoll erwiesen (Restifo et al., 2012). Bisher wurden beim adoptiven T-Zelltransfer meist CD8⁺ T-Zellen eingesetzt, diese haben aber eine weniger starke und langanhaltendere Wirkung als die Kombination von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen gezeigt (Ruella and Kalos, 2014). Von Perez-Diez et al.

wurde sogar eine teils bessere Bekämpfung von Tumorzellen durch CD4⁺ T-Zellen als durch CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen (Perez-Diez et al., 2007). Zudem haben CD4⁺ T_H1-Zellen noch weitere Funktionen, wie zum Beispiel die Anti-Angiogenese, welche bei der Bekämpfung von Neoplasien eine Rolle spielen (Wieder et al., 2008). Auch sind CD4⁺ T-Zellen mit einem T_H1-Phänotyp zur Induktion von Apoptose und Seneszenz in der Lage (Kayser et al., 2015). Aufgrund dieser Forschungsergebnisse wurde der Fokus in der vorliegenden Arbeit auf CD4⁺ T-Zellen gelegt.

Für die Herstellung von Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurden drei freiwillige Spender mittels Immunomonitoring auf das Vorliegen von Tumorantigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen gescreent. Hierfür wurde eine 11- bzw. 13-tägige in vitro Stimulation der PBMCs mit den überlappenden Peptidmischen für die entsprechenden Tumorantigene durchgeführt. Da alle drei Spender für die gewünschten Tumorantigene MAGE-A3, PRAME und ROR1 positiv waren, konnte nach dem Herstellungsprotokoll, welches durch eine Arbeitsgruppe des Universitätsklinikums Tübingen 2013 etabliert wurde, mit der Generierung von Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen begonnen werden (Kayser et al., 2015). Spenderin 1 war neben den drei TA noch für die CTA MAGE-A1 und NY-ESO-1 positiv. Spenderin 2 war neben den drei gewünschten Tumorantigenen ebenfalls für das CTA NY-ESO-1 positiv und Spender 3 neben PRAME auch für MAGE-A1 und -A3. Das Vorkommen von Tumorantigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und deren Wirkung bei der Bekämpfung von Krebserkrankungen wurde bereits durch mehrere Arbeitsgruppen belegt, so dass sich diese Arbeit auf die Herstellung von CD4⁺ T-Zellen konzentrierte (Matko et al., 2018, Przybyla et al., 2019).

Es wurden spezifische IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen für MAGE-A3, PRAME (3x) und ROR1 mittels magnetischer Anreicherung (IFN- γ) aus PBMCs durch die Stimulation mit überlappenden Peptidmischen hergestellt und anschließend über 14 Tage expandiert. Spenderin 1 wurde für die Generierung von MAGE-A3, PRAME und ROR1 spezifischen IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen, Spender 2 und 3 für die Generierung von PRAME spezifischen IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen eingesetzt. In der Expansionsphase kam es zu hohen bzw. sehr hohen Zellzahlen, so dass weitere

Experimente durchgeführt werden konnten. Einzig bei Spenderin 2 war die Durchführung aller geplanten Experimente nicht möglich, da sie nicht mehr zur Blutspende bereitstand und somit PBMCs zur Herstellung von Dendritischen Zellen fehlten.

Es wurde in allen Läufen eine hervorragende Vitalität ($96,06\% \pm 2,15$) erzielt. Zudem lagen vorwiegend Tumorantigen-spezifische $\text{IFN-}\gamma^+$ CD4^+ T-Zellen ($71,30\% \pm 18,26$) vor, wobei PRAME (3) einen negativen Ausreißer darstellte ($40,27\%$). Bei den PRAME (3) generierten CD4^+ T-Zellen lag neben diesen ein verhältnismäßig hoher Anteil an $\text{CD3}^+/\text{CD56}^+/\text{CD8}^+$ T-Zellen ($23,51\%$; MW $9,71\% \pm 7,39$) vor. Hohe $\text{CD3}^+/\text{CD56}^+$ Zellzahlen fielen bei Spender 3 bereits im Screening auf, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass diese Zellen bereits angereichert und expandiert wurden. Bei dieser Zellpopulation könnte es sich um sogenannte Natürliche Killer T-Zellen handeln (NKT), welche Eigenschaften von Natürlichen Killerzellen und von T-Zellen besitzen (Kelly-Rogers et al., 2006). Um sicher zu gehen, ob es sich um NKT Zellen handelt, müssten noch weitere Marker bestimmt werden.

Die generierten $\text{IFN-}\gamma$ sezernierenden CD4^+ T-Zellen waren vorwiegend T-Gedächtniszellen vom Effektortyp (T_{EM} : $95,14\% \pm 3,34$). T-Gedächtniszellen vom Effektortyp haben, neben einer schnellen und wirksamen Effektorfunktion, eine gewisse Langlebigkeit, so dass von einem verhältnismäßig langanhaltenden Effekt auf maligne Zellen ausgegangen werden kann (Mahnke et al., 2013). Zudem wurde eine Untersuchung des Zytokinprofils der generierten T-Zellen durchgeführt, um den Phänotyp der CD4^+ T-Zellen zu bestimmen. Alle generierten CD4^+ T-Zellen sezernierten, nach erneuter Stimulation mit dem entsprechenden überlappenden Peptidmix, $\text{IFN-}\gamma$, IL-2 und $\text{TNF-}\alpha$. Diese Zytokine werden typischerweise mit CD4^+ T_H1 Zellen assoziiert (Zhu et al., 2010). Im nächsten Schritt wurden die generierten CD4^+ T-Zellen dahingehend untersucht, ob sie die zytotoxischen Marker CD107a und Granzyme B nach einer Restimulation mit dem entsprechenden überlappenden Tumorantigen-Peptidmix, sezernieren. Alle generierten Tumorantigen-spezifischen $\text{IFN-}\gamma^+$ CD4^+ T-Zellen sezernierten sowohl CD107a wie auch Granzyme B, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Dass Tumorantigen-spezifische CD4^+ T-Zellen Apoptose in

Tumorzellen induzieren können wurde von einer Arbeitsgruppe des Universitätsklinikums Tübingen am Beispiel der generierten NY-ESO-1 spezifischen CD4⁺ T-Zellen gezeigt (Kayser et al., 2015). Ob die hier generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen direkt Apoptose in malignen Zellen induzieren könnte durch zytotoxische Assays mit HLA-passenden Tumorantigen-exprimierenden Zelllinien herausgefunden werden.

Zudem wurde noch eine Zellpopulation gefunden, welche kein IFN- γ , aber Granzyme B sezernierte und CD107a exprimierte. Diese Subgruppe war vorwiegend bei PRAME (3), aber auch in geringerem Umfang bei den anderen generierten CD4⁺ T-Zellen zu finden. Bei dieser Zellpopulation könnte es sich um Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) handeln. LAK sind eine sehr heterogene Zellgruppe, welche IL-2 zur Aktivierung benötigen. Darüber hinaus können Dendritische Zellen LAK in vitro reziprok aktivieren (West et al., 2011), wodurch das Vorliegen dieser Zellpopulation erklärt werden könnte.

Die generierten Tumorantigen-spezifischen T-Zellen zeigten eine sehr gute Vitalität, waren vorwiegend CD4⁺ T-Zellen mit einem T_H1 Phänotyp und sezernierten nach einer Restimulation zytotoxische Granula, wie beispielsweise Granzyme B.

4.3 Proliferationspotential der Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T_H1 Zellen

Für den adoptiven T-Zelltransfer sollten die *ex vivo* selektionierten und expandierten T-Zellen nach deren Infusion möglichst lange weiter proliferieren, um eine langanhaltende Wirkung gegen das Malignom zu erzielen. Aus diesem Grund wurde das Proliferationspotential der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen mittels sechstägigem CFSE-Assay ermittelt. Leider konnte dieser Assay nicht für die PRAME (2) spezifischen CD4⁺ T-Zellen durchgeführt werden, da keine Dendritischen Zellen für die Restimulation hergestellt werden konnten, da Spenderin 2 nicht mehr zur Blutentnahme bereitstand. Die untersuchten generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zeigten, im Vergleich zur Negativkontrolle, nach einer Restimulation mit DCs und überlappenden Peptidmix, eine bessere Vitalität. Dass die

Negativkontrollen eine schlechte Vitalität aufwiesen, war zu erwarten, da T-Zellen zum Überleben und für die Proliferation einen Antigen-Stimulus benötigen (Ferreira et al., 2000). Erstaunlich ist, dass die MAGE-A3 und die PRAME (3) generierten T-Zellen eine ähnlich schlechte Vitalität wie die Kontrollzellen aufwiesen. Bei den PRAME (3) Zellen könnte es daran liegen, dass hier neben den CD4⁺ T-Zellen, wie in 4.2 beschrieben, auch NKT Zellen vorlagen. Diese können die pro-inflammatorische Funktion von aktivierten T-Zellen und DCs inhibieren (Dasgupta and Kumar, 2016, Dhodapkar and Kumar, 2017) und sind sogar in der Lage Antigen-präsentierende DCs abzutöten (Wang et al., 2015). Bei den MAGE-A3 CD4⁺ T-Zellen könnte ein Grund für die geringe Vitalität sein, dass die Zellen bereits erschöpft sind. Eine T-Zell-Erschöpfung dient ursprünglich als Schutz vor einer Überstimulation und führt zu einer verminderten Produktion von Zytokinen und einer höheren Expression von CTLA-4, PD1, LAG3 und TIM3 (Blackburn et al., 2009, Matsuzaki et al., 2010, Wherry and Kurachi, 2015, Tan et al., 2018, Balkhi et al., 2015). Der Endpunkt der Erschöpfung von T-Zellen mündet in deren Apoptose, was die geringe Vitalität erklären könnte (Voss et al., 2017).

Außerdem ist aufgefallen, dass alle proliferierenden generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen kaum IFN- γ sezernierten. Dies könnte ebenfalls daran liegen, dass die Zellen aufgrund von vielen Restimulationen bereits erschöpft sind bzw. gerade auf dem Weg in eine Erschöpfung sind. Für eine genauere Bestimmung, in welchem Status sich die generierten Zellen befinden, wäre die Analyse der zu diesem Zeitpunkt sezernierten Zytokine sinnvoll gewesen, da erschöpfte T-Zellen dazu übergehen anstatt der Zytokine IFN- γ , IL-2 und TNF- α die Zytokine IL-10 und TGF- β zu sezernieren (Balkhi et al., 2015).

4.4 Expression der Immun-Checkpoints der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T_H1 Zellen

Erschöpfte T-Zellen weisen diverse Unterschiede zu aktiven T-Zellen auf: Ihre Proliferationskapazität, ihre Sekretion von IL-2 und proinflammatorischen Zytokinen und ihr zytotoxisches Potential sind verringert, wohingegen sie vermehrt inhibitorische Signalwege, sogenannte Immun-Checkpoints, wie zum

Beispiel CTLA-4, PD1, LAG3 oder TIM3 exprimieren (Blackburn et al., 2009, Pauken and Wherry, 2015). Aus diesem Grund wurde die Expression verschiedener Immun-Checkpoints durchflusszytometrisch im CD107a (LAG3, PD1 und TIM3) und im CFSE-Assay (B7-H3, LAG3, PD1 und TIM3) untersucht. Einzige Ausnahme bildeten erneut die PRAME (2) spezifischen CD4⁺ T-Zellen, da der CFSE-Assay hierfür, aufgrund fehlender DCs, nicht durchgeführt werden konnte. Im CD107a-Assay lag eine hohe Expression für die Immun-Checkpoints PD1 und TIM3 vor (MW 43% bzw. 42%), wobei die MAGE-A3 spezifischen CD4⁺ T-Zellen im CD107a-Assay jeweils die höchsten Expressionswerte hatten. Im CFSE-Assay hingegen war die Expression von PD1 und TIM3 der MAGE-A3 spezifischen und die PD1-Expression der PRAME (1) spezifischen CD4⁺ T-Zellen, im Vergleich zum CD107a-Assay, leicht erniedrigt. Ausgehend davon, dass mehrfache Restimulationen zur Erschöpfung und im Endeffekt zur Apoptose der T-Zellen führen (Voss et al., 2017) könnte es sein, dass in beiden Assays die MAGE-A3 spezifischen T-Zellen bereits größtenteils erschöpft waren und durch die zusätzliche Restimulation im CFSE-Assay einige Zellen bereits in Apoptose gegangen waren, wodurch die hohe Expression von Immun-Checkpoints und die schlechte Vitalität im CFSE-Assay erklärt werden könnte. Zusätzlich kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen durch mehrfache Restimulationen unter einer stärkeren Erschöpfung litten, da alle Immun-Checkpoints, außer der oben genannten Ausnahmen, im CFSE-Assay eine höhere Expression als im CD107a-Assay (eine Restimulation weniger) zeigten. Besonders LAG3 zeigte eine deutlich höhere Expression (MW LAG3: CD107a 13%, CFSE 53%). Aber auch für PD1 und TIM3 war eine deutliche Erhöhung der Immun-Checkpoint-Expression zu sehen (+21% bzw. +25%). Dies könnte aber auch daran liegen, dass die Hochregulation der Expression der Immun-Checkpoints auf T-Zellen länger als vier Stunden (Restimulationszeit des CD107a-Assays) benötigt.

4.5 Divergierende Wirkung von Immun-Checkpoint-Inhibitoren auf das zytotoxische und Proliferationspotential der generierten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T_H1 Zellen

Immun-Checkpoints sind inhibitorische Signalwege, welche überschießende Reaktionen auf körpereigene Substanzen über eine Kopplung spezifischer Liganden an den entsprechenden Rezeptor verhindern sollen (Pardoll, 2012, Topalian, 2017). Bei malignen Erkrankungen sind Rezeptoren bzw. Liganden von Immun-Checkpoints oft überexprimiert um einer effektiven Bekämpfung durch das Immunsystem zu entgehen (Pardoll, 2012). Zudem exprimieren T-Zellen, wenn sie erschöpft sind, vermehrt verschiedene Immun-Checkpoints, wie zum Beispiel CTLA-4, PD1, LAG3 oder TIM3.

Dies führt zu einer zusätzlichen Schwächung der Immunantwort (Catakovic et al., 2017). Immun-Checkpoint-Inhibitoren sind Antikörper, welche die Bindung des Liganden an den Rezeptor blockieren (Topalian, 2017). Diese können die Immunantwort einerseits dadurch erhöhen, dass sie an die malignen Zellen binden und somit die inhibitorische Wirkung auf T-Zellen verringern, und andererseits durch Bindung an die T-Zellen deren Erschöpfung hinauszögern. Insgesamt wird davon ausgegangen, dass der Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren bei einem Teil der Tumorerkrankungen zu einer effektiveren und langanhaltenderen Wirkung der Immunzellen auf die neoplastischen Zellen führt (Dyck and Mills, 2017). Daher wurden im zytotoxischen und im Proliferations-Assay der generierten CD4⁺ T-Zellen teilweise die Immun-Checkpoint-Inhibitoren für B7-H3, LAG3, PD1 und TIM3 mitgeführt und deren Wirkung analysiert.

An dieser Stelle gibt es zwei Punkte zu diskutieren: Zum einen waren in den durchgeführten Assays keine Zielzellen sondern nur T-Zellen und der entsprechende überlappende Peptidmix vorhanden. Dem darauf aufbauenden Einspruch, dass der Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren keinen Sinn ergibt, da keine Rezeptor-Ligand-Interaktion getrennt bzw. verhindert werden kann, kann jedoch wie folgt begegnet werden: Es wurde nachgewiesen, dass T-Zellen neben PD1 auch PD-L1 und PD-L2, wie Tumorzellen oder DCs, exprimieren können (Dyck and Mills, 2017) und daher auch ohne Zielzelle Interaktionen *in vitro* möglich sind.

Zum anderen konnte festgestellt werden, dass die blockierenden PD1 und TIM3 Antikörper in der verwendeten Konzentration den entsprechenden Immun-Checkpoint blockiert haben. Diese Aussage ist möglich, da die Fluorochrom-konjugierten und blockierenden Antikörper PD1 und TIM3 den gleichen Klon hatten und die Fluorochrom-konjugierten Antikörper bei Einsatz der blockierenden Antikörper nicht an PD1 und TIM3 binden konnten. Für die blockierenden Antikörper von B7-H3 und LAG3 hingegen ist aufgrund der Tatsache, dass verschiedene Klone eingesetzt wurden, nicht klar, ob die blockierenden Antikörper wirklich in der eingesetzten Konzentration blockiert haben. Dies könnte durch den Einsatz von Fluorochrom-konjugierten und blockierenden Antikörpern des gleichen Klons überprüft werden.

Im CD107a-Assay konnte eine Steigerung des Granzyme B abhängigen zytotoxischen Potentials erzielt werden. Für die CD107a Expression konnte ebenfalls eine Steigerung durch den Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren erreicht werden, aber nicht für die PRAME (2) und (3) spezifischen T-Zellen. Für weitere Immun-Checkpoint-Inhibitoren wie B7-H3, LAG3 und TIM3 war die Steigerung bezüglich der Granzyme B⁺ und CD107a⁺ IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen sehr unterschiedlich, wobei für Granzyme B höhere und häufigere Steigerungen zu verzeichnen waren. Im CFSE-Assay kam es, bis auf für die MAGE-A3 spezifischen CD4⁺ T-Zellen, zu einer Steigerung des Proliferationspotentials. Diese Effekte im CD107a und im CFSE-Assay waren aber nicht signifikant, da in der Negativkontrolle ebenfalls ein Anstieg der entsprechende Zellpopulation vorkam. Dies könnte daran liegen, dass alle CD4⁺ T-Zellen, einschließlich der Kontrollzellen, welche mit MOG-restimuliert worden sind, erschöpft waren und durch den Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren eine verbesserte T-Zellfunktion erreicht wurde, auch der Zellen der Negativkontrolle. Ob der Effekt der einzelnen Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen signifikant gewesen wäre, müsste durch Replikate abgeklärt werden. Zudem waren im CD107a-Assay mehr der generierten CD4⁺ T-Zellen IFN- γ ⁺, wenn der Immun-Checkpoint-Inhibitor PD1 oder PD1 in Kombination mit TIM3 eingesetzt wurde. Dieser Versuch wurde aber nur für die PRAME (2) spezifischen CD4⁺ T-Zellen

durchgeführt, so dass zur Verifizierung der Ergebnisse Replikate angefertigt werden müssten, sowie Experimente mit anderen spezifischen CD4⁺ T-Zellen.

4.6 Induktion von Seneszenz der Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T_H1 Zellen bei der Melanomzelllinie WM115

Zellen können durch diverse Ursachen, wie zum Beispiel DNA-Schäden, Onkogene oder Stress, in einen Wachstumsstillstand, die sogenannte Seneszenz, übergehen. Im Status der Seneszenz sind Zellen unter anderem nicht mehr dazu in der Lage zu proliferieren und sind gegenüber Apoptose-Signalen unempfindlich. Neben der Morphologie ändert sich auch der sekretorische Phänotyp der Zellen, so dass die seneszenten Zellen Angiogenese, Zellproliferation oder Inflammation stimulieren können (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007, Campisi, 2013). Dieser sekretorische Phänotyp hatte im Mausmodell positiven wie auch negativen Einfluss auf die Proliferation von Neoplasien (Coppe et al., 2006). Vermutlich haben seneszente Zellen in jungen Jahren eine hemmende und im Alter eine begünstigende Wirkung auf die Entstehung von Krebs (de Magalhaes and Passos, 2018). Seneszenz kann durch IFN- γ und TNF- α in Krebszellen induziert werden (Wieder et al., 2008, Braumüller et al., 2013), unterscheidet sich jedoch offenbar durch den von Chemotherapeutika erzeugten Wachstumsstillstand (Sapega et al., 2018).

Für den Nachweis, dass die generierten, Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen Seneszenz in Tumorzelllinien induzieren können, wurden BrdU-Assays mit Überständen der Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, außer den PRAME (2) spezifischen T-Zellen, durchgeführt. Für diese Versuche wurde die Melanomzelllinie WM115 verwendet, da für diese Zelllinie bereits belegt ist, dass durch IFN- γ und TNF- α Seneszenz induziert werden kann (Kayser et al., 2015). In der durchflusszytometrischen Untersuchung war zu sehen, dass die T-Zellen vor allem in der G0/G1-Phase gestoppt wurden, aber auch in einigen Zellen Apoptose induziert worden war. Diese Ergebnisse entsprechen Forschungsergebnissen, welche IFN- γ eher eine zytostatische als zytotoxische Wirkung zuschreiben, weswegen die meisten Tumorzellen einen Wachstumsstillstand in der G1-Phase aufweisen (Kakimi et al., 2015).

Erstaunlich ist, dass die Negativkontrolle (mit MOG-Peptidmix restimuliert) der MAGE-A3, PRAME (1) und ROR-1 spezifischen CD4⁺ T-Zellen ebenfalls einen, der Positivkontrolle (IFN- γ : 100 ng/ml; TNF- α : 10 ng/ml) entsprechenden Wachstumsstillstand induzierten. Da dies bei den PRAME (3) spezifischen T-Zellen nicht zu sehen war, wird davon ausgegangen, dass dies ein Spender-abhängiger Effekt ist. Um das Ergebnis zu verifizieren, wäre eine breiter angelegte Studie nötig. Zudem wurde nicht die Menge der sezernierten Zytokine, sondern die Prozentzahl der Zytokin-sezernierenden Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen gemessen. Durch eine Bestimmung der Sekretion wäre ein besserer Vergleich mit der Positivkontrolle möglich, würde aber in Hinsicht auf die Negativkontrollen auch keinen Aufschluss über die Ursache deren Wirkung geben.

Des Weiteren wurde in Experimenten zur Auswahl des Mediums, in welchem die Überstände generiert und die Tumorzellen kultiviert werden sollen, gesehen, dass in AB-Medium, verglichen mit RPMI-Medium mit 20% FCS, mehr apoptotische Zellen vorliegen. Besonders eindrücklich waren diese Unterschiede in den Tumorantigen-spezifischen Überständen und der Positivkontrolle, das heißt, wenn die Zytokine IFN- γ und TNF- α vorlagen. Dies könnte daran liegen, dass durch das AB-Serum anstatt einer zytostatischen eine zytotoxische Wirkung im Beisein der Zytokine aktiviert wird oder dass Inhaltsstoffe des AB-Mediums eine andere Wirkungsweise der CD4⁺ T-Zellen unterstützen bzw. aktivieren. Hierfür müssten weitere Experimente zur Entschlüsselung der genauen Zusammensetzung des AB-Mediums durchgeführt werden.

Zur Klärung, ob die Induktion von Seneszenz von Dauer sein würde, wurden die Tumorzellen gewaschen und mit neuem Medium, ohne die Zugabe der Zytokine IFN- γ und TNF- α , nach dem BrdU-Assay für neun weitere Tage kultiviert. Dieser Versuch wurde nur für die mit PRAME (1), PRAME (3) und ROR1 Überständen behandelten Zellen, sowie deren Negativkontrolle (MOG-stimuliert) durchgeführt. Hier war deutlich zu sehen, dass die Zellen, die im BrdU-Assay mit MOG-Überständen behandelt worden waren, wieder anfangen zu proliferieren, wohingegen die Zellen, die mit Tumorantigen-spezifischen Überständen behandelt worden waren, keine bzw. nur eine sehr geringfügige Proliferation

zeigten. Da in Studien beschrieben worden ist, dass IFN- γ und TNF- α einen reversiblen Wachstumsstillstand, nicht jedoch Seneszenz induzieren (Sapega et al., 2018), stellt sich die Frage, ob der Versuch dieser Arbeit von zu kurzer Dauer war, da in Studien erst um Tag 20 eine erneute Proliferation einsetzte oder ob andere Ursachen wirksam wurden, da die Negativkontrollen bereits wieder zu proliferieren begonnen hatten. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll, den Versuch auf eine längere Zeitspanne auszuweiten und die Tumorzellen auf für Seneszenz typische Charakteristika wie zum Beispiel morphologische Veränderungen, den β -Galaktosidase-Marker, verstärkte Expression von Zyklus-abhängige Kinase-Inhibitoren wie p21 und p27 oder die Induktion von Umgebungs-Seneszenz zu untersuchen (Bringold and Serrano, 2000).

4.7 Keine Induktion von Seneszenz beim Ewing Sarkom RDES mittels IFN- γ und TNF- α möglich

Eigentlich sollten die Sarkomzelllinien auf ihre Fähigkeit, in Seneszenz zu gehen, untersucht werden. Dies wurde ebenfalls mittels BrdU-Assay für die Ewing Sarkomzelllinie RDES mit IFN- γ und TNF- α (IFN- γ : 100 ng/ml; TNF- α : 10 ng/ml) und unbehandelten Tumorzellen als Mediumkontrolle (ohne Tumorantigen-spezifische Überstände) durchgeführt. Hierbei war zu sehen, dass die Tumorzellen durch die Zugabe von IFN- γ und TNF- α nicht im Geringsten in ihrer Proliferation gehemmt waren. Da der IFN- γ und TNF- α abhängige Wachstumsstillstand mit der Induktion des transformierten Wachstumsfaktor- β Signalwegs, der anschließenden Induktion des NADPH-Oxidase-4-Proteins und oxidativem Stress assoziiert ist (Sapega et al., 2018), stellt sich die Frage, ob diese Mechanismen bei der Zelllinie RDES nicht vorhanden oder blockiert sind, oder ob der oxidative Stress nicht ausreichend gewesen ist um Seneszenz zu induzieren. Um dies zu verifizieren, könnten weitere Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen an IFN- γ und TNF- α durchgeführt werden.

4.8 Schlussfolgerungen

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit wurde die Expression von Cancer-Testis-Antigenen für bestimmte Ewing und Osteosarkomzelllinien, teilweise zum ersten Mal, mittels quantitativer real-time PCR bestimmt, sowie deren Änderung der Expression durch den Einsatz der epigenetischen Substanz Decitabine, einem DNA-Methyltransferaseinhibitor, analysiert. Die Validität der Ergebnisse wird durch eine bereits publizierte Arbeit einer anderen Forschungsgruppe teilweise bestätigt.

Die Expression des Transmembranproteins B7-H3 und des Tyrosinkinase-Transmembranrezeptors ROR1 wurde durchflusszytometrisch untersucht. Neben der durchflusszytometrischen Analyse verschiedener Tumorzelllinien auf ihre Expression von ROR1 und B7-H3 sollte noch eine mRNA basierte Expression mittels qRT-PCR durchgeführt werden, um die Expression im Verhältnis zu den Vorläuferzellen interpretieren zu können. Dies ist vor allem in Hinblick auf die divergierende Studienlage bezüglich des Vorkommens von B7-H3 und ROR1 sinnvoll. Außerdem könnten zusätzlich benigne Zellarten untersucht werden, um das Vorkommen und somit die Möglichkeit von B7-H3 und ROR1 als Therapie-Targets zu klären.

In der vorliegenden Arbeit konnten außerdem MAGE-A3 und zum ersten Mal PRAME- und ROR1-spezifische CD4⁺ T-Zellen von gesunden Spendern mittels magnetischer IFN- γ Anreicherung nach einem durch das Labor etablierten Protokoll hergestellt werden. Die generierten Tumorantigen-spezifischen T-Zellen lagen am Ende der Expansion in sehr hoher Zellzahl vor, hatten eine hohe Vitalität und Spezifität. Die Expansionszeit konnte im Vergleich zu anderen Protokollen relativ kurzgehalten werden, so dass die Zellen ein zytotoxisches Potential besaßen und noch zu weiterer Proliferation fähig waren. Zur Bestimmung des Phänotyps der generierten CD4⁺ T-Zellen wurde auf die Sekretion von bestimmten, vor allem T_H1-Zytokinen gescreent. Daher könnten weitere Experimente durchgeführt werden, um andere T-Zell Subtypen über die Sekretion von Zytokinen zu identifizieren. Des Weiteren wurde die Expression von Immun-Checkpoints, sowie die Wirkung von Immun-Checkpoint-Inhibitoren in zwei verschiedenen Assays untersucht. Hier sollten weiterführende

Experimente mit festgelegten Immun-Checkpoint-Inhibitoren bzw. einer Kombination von ihnen durchgeführt werden. Am besten wäre es, wenn man bei starker Expression von Immun-Checkpoints weitere Experimente anschließt, welche eine Aussage über die Erschöpfung der Zellen zuließen.

Als letztes wurden die Zytokin-reichen Überstände auf ihre Fähigkeit, Seneszenz bzw. einen Wachstumsstopp zu induzieren, untersucht. Hier gilt es durch weiterführende Experimente zu klären, warum die Negativkontrollen teilweise ebenfalls dazu in der Lage waren, einen Wachstumsstillstand zu induzieren, und woran es lag, dass die Ewing Sarkomzelllinie RDES nicht in einen Wachstumsstillstand übergegangen ist.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden *in vitro* durchgeführt, so dass es *in vivo* zu Abweichungen der hier beschriebenen Ergebnisse kommen kann. Daher wäre eine *in vivo* Testung der generierten Tumorantigen-spezifischen T-Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Proliferation bzw. deren Expansionsfähigkeit und des Potentials zytotoxisch oder zytostatisch zu wirken, interessant. Zudem könnte die Wirkung der hergestellten Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zusätzlich noch in Kombination mit einer Decitabine-Therapie oder bzw. und dem Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren *in vivo* analysiert werden.

5 Zusammenfassung

Osteosarkome sind die häufigsten und Ewing Sarkome die zweithäufigsten soliden Tumore bei Kindern und Jugendlichen. Die Prognose von Erkrankten ist, vor allem wenn das Sarkom zum Zeitpunkt der Diagnose bereits metastasiert ist oder ein Rezidiv auftritt, seit circa 20 Jahren gleichbleibend infaust mit einem 5-Jahres-Überleben von etwa 20 Prozent. Aus diesem Grund sind neue Therapien bzw. Therapieansätze nötig. Eine Möglichkeit ist ein adoptiver T-Zelltransfer von Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in Kombination mit dem epigenetisch wirksamen, demethylierenden Agens Decitabine und Immun-Checkpoint-Inhibitoren.

Ziel der Arbeit war es, die Expression der Cancer-Testis-Antigene MAGE-A1, MAGE-A3, NY-ESO-1 und PRAME, sowie deren Änderung der Expression nach einer fünftägigen Behandlung mit der epigenetischen Reagenz Decitabine, einem DNA-Methyltransferaseinhibitor, mittels quantitativer real-time PCR zu ermitteln. Für die Ewing Sarkomzelllinien konnte durch die Decitabine-Therapie eine vorwiegend sehr starke Hochregulation der Expression der vier Cancer-Testis-Antigene nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildete die Zelllinie RDES, hier kam es durch den Einsatz von Decitabine sogar zu einer *de novo* Expression des Cancer-Testis-Antigens NY-ESO-1. Bei den Osteosarkomzelllinien konnte durch Decitabine nur teilweise eine relevante Hochregulation der CTA-Expression verzeichnet werden. Eine sehr starke Hochregulation war bei den Osteosarkomzelllinien für das CTA NY-ESO-1 ermittelt worden. Zusätzlich wurden, neben den Ewing und Osteosarkomzelllinien, noch Rhabdomyosarkom- und Melanomzelllinien durchflusszytometrisch auf die Expression des Transmembranproteins B7-H3 und des Tyrosinkinase-Transmembranrezeptor ROR1 untersucht. Nahezu alle analysierten Zelllinien exprimierten B7-H3 und ROR1 stark (B7-H3: MW 73,10 % ± 29,10; ROR1: MW 59,42 ± 29,51).

Ein weiteres Ziel war es Tumorantigen-spezifische IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen von gesunden Spendern mittels magnetischer Anreicherung (*IFN- γ Capture Technik*) für die Cancer-Testis-Antigene MAGE-A3 und PRAME (3x) sowie das Tumorantigen ROR1 zu isolieren und anschließend zu expandieren.

Hierfür wurden im ersten Schritt gesunde Spender auf das Vorliegen von Tumorantigen-spezifischen IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen mittels einer *in vitro* T-Zellstimulation mit überlappenden Peptidmischen und einem anschließenden FACS-Immunmonitoring untersucht. Nach der Identifizierung der möglichen Spender konnte mit der eigentlichen Herstellung der T-Zellen begonnen werden. Hierbei konnten sehr hohe Zellzahlen erreicht werden, obwohl nicht alle Zellen nach der magnetischen Anreicherung verarbeitet werden konnten (MW $5,24 \cdot 10^9$ Zellen $\pm 5,80 \cdot 10^9$; einen positiven Ausreißer stellte PRAME (2) mit $16,65 \cdot 10^9$ Zellen dar). Die hergestellten Zellen wiesen mit einem Mittelwert von 96,06 % ($\pm 2,15$) eine sehr gute Vitalität auf. Zudem waren, bis auf bei den PRAME (3) Zellen, hohe Mengen an IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen expandiert worden (MW 71,30 % $\pm 18,26$) und fast alle der IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen waren zu T-Gedächtniszellen des Effektorotyps ausdifferenziert (95,14 % $\pm 3,34$). Des Weiteren lag bei den generierten IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen ein T_H1-Phänotyp vor (Sekretion der Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2), wobei TNF- α vor IFN- γ das führende Zytokin darstellte. Darüber hinaus zeigten die generierten Tumorantigen-spezifischen IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen im CD107a und im CFSE-Assay alle ein zytotoxisches Potential und die Fähigkeit zu proliferieren, wenn auch in unterschiedlich hohem Maße.

Die Expression der Immun-Checkpoints nahm bei fast allen Tumorantigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen im CFSE-Assay, verglichen mit dem CD107a-Assay, stark zu. Der Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren führte zu einer Steigerung der Proliferation, wobei der Effekt annähernd verschwand, wenn man die Proliferation in Abhängigkeit zur entsprechenden Negativkontrolle betrachtete, da diese ebenfalls eine gesteigerte Proliferation aufwies. Das zytotoxische Potential konnte, mit der Ausnahme der MAGE-A3 spezifischen CD4⁺ T-Zellen, durch die Verwendung von Immun-Checkpoint-Inhibitoren ebenfalls gesteigert werden.

Nachdem die vorherigen Experimente abgearbeitet worden waren, konnte das nächste Ziel, die Wirkung der generierten T-Zellen auf die Tumorzellen, mittels BrdU-Assay, in Angriff genommen werden. Hierfür wurde die Melanomzelllinie WM115 ausgewählt, da bei dieser über die Zytokine IFN- γ und TNF- α Seneszenz

induziert werden kann. Die Überstände der generierten Tumorantigen-spezifischen IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen waren in der Lage bei der Melanomzelllinie WM115 einen Wachstumsstillstand, vorwiegend in der G0/G1-Phase des Zellzyklus, und eine reduzierte S-Phase zu induzieren. Ein zweimaliger Versuch über neun Tage, ob die Zellen nach Entfernung der Zytokine wieder proliferieren, schlug fehl, so dass von einem vorübergehenden Wachstumsstillstand ausgegangen werden kann. Im Gegensatz dazu konnte durch den Einsatz der Zytokine IFN- γ und TNF- α kein messbarer Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen des Ewing Sarkoms RDES festgestellt werden.

Die Kombination des adoptiven T-Zelltransfers von generierten spezifischen CD4⁺ T-Zellen mit einer epigenetischen Modulation und dem Einsatz von Immun-Checkpoint-Inhibitoren scheint ein Erfolg versprechender Ansatz für die Behandlung von Krebserkrankungen zu sein. Jedoch muss noch weitere Forschungsarbeit betrieben werden, bis die konkreten Abläufe, sowie die Effekte der Immun-Checkpoint-Inhibitoren auf die generierten T-Zellen im Detail verstanden sind.

6 Literaturverzeichnis

- ABRIL-RODRIGUEZ, G. & RIBAS, A. 2017. SnapShot: Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Cell*, 31, 848-848.e1.
- ALLISON, D. C., CARNEY, S. C., AHLMANN, E. R., HENDIFAR, A., CHAWLA, S., FEDENKO, A., ANGELES, C. & MENENDEZ, L. R. 2012. A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era. *Sarcoma*, 2012, 704872.
- ANDERSON, A. C., JOLLER, N. & KUCHROO, V. K. 2016. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*, 44, 989-1004.
- ANDERSON, P. M., MEYERS, P., KLEINERMAN, E., VENKATAKRISHNAN, K., HUGHES, D. P., HERZOG, C., HUH, W., SUTPHIN, R., VYAS, Y. M., SHEN, V., WARWICK, A., YEAGER, N., OLIVA, C., WANG, B., LIU, Y. & CHOU, A. 2014. Mifamurtide in metastatic and recurrent osteosarcoma: a patient access study with pharmacokinetic, pharmacodynamic, and safety assessments. *Pediatr Blood Cancer*, 61, 238-44.
- ANNINGA, J. K., GELDERBLUM, H., FIOCCO, M., KROEP, J. R., TAMINIAU, A. H., HOGENDOORN, P. C. & EGELER, R. M. 2011. Chemotherapeutic adjuvant treatment for osteosarcoma: where do we stand? *Eur J Cancer*, 47, 2431-45.
- ANTONESCU, C. 2014. Round cell sarcomas beyond Ewing: emerging entities. *Histopathology*, 64, 26-37.
- ANTONY, P. A., PICCIRILLO, C. A., AKPINARLI, A., FINKELSTEIN, S. E., SPEISS, P. J., SURMAN, D. R., PALMER, D. C., CHAN, C. C., KLEBANOFF, C. A., OVERWIJK, W. W., ROSENBERG, S. A. & RESTIFO, N. P. 2005. CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol*, 174, 2591-601.
- ARVAND, A. & DENNY, C. T. 2001. Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene*, 20, 5747-54.
- AYYOUB, M., MIGLIACCIO, M., GUILLAUME, P., LIENARD, D., CEROTTINI, J. C., ROMERO, P., LEVY, F., SPEISER, D. E. & VALMORI, D. 2001. Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8(+) T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing. *Eur J Immunol*, 31, 2642-51.
- BALAKRISHNAN, A., GOODPASTER, T., RANDOLPH-HABECKER, J., HOFFSTROM, B. G., JALIKIS, F. G., KOCH, L. K., BERGER, C., KOSASIH, P. L., RAJAN, A., SOMMERMEYER, D., PORTER, P. L. & RIDDELL, S. R. 2017. Analysis of ROR1 Protein Expression in Human Cancer and Normal Tissues. *Clin Cancer Res*, 23, 3061-3071.
- BALKHI, M. Y., MA, Q., AHMAD, S. & JUNGHANS, R. P. 2015. T cell exhaustion and Interleukin 2 downregulation. *Cytokine*, 71, 339-47.

- BAO, L., DUNHAM, K. & LUCAS, K. 2011. MAGE-A1, MAGE-A3, and NY-ESO-1 can be upregulated on neuroblastoma cells to facilitate cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor cell killing. *Cancer Immunol Immunother*, 60, 1299-307.
- BAYLIN, S. B. 2005. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2 Suppl 1, S4-11.
- BERGHUIS, D., SANTOS, S. J., BAELDE, H. J., TAMINIAU, A. H., EGELER, R. M., SCHILHAM, M. W., HOGENDOORN, P. C. & LANKESTER, A. C. 2011. Pro-inflammatory chemokine-chemokine receptor interactions within the Ewing sarcoma microenvironment determine CD8(+) T-lymphocyte infiltration and affect tumour progression. *J Pathol*, 223, 347-57.
- BERTRAM, J., PALFNER, K., HIDDEMANN, W. & KNEBA, M. 1998. Elevated expression of S100P, CAPL and MAGE 3 in doxorubicin-resistant cell lines: comparison of mRNA differential display reverse transcription-polymerase chain reaction and subtractive suppressive hybridization for the analysis of differential gene expression. *Anticancer Drugs*, 9, 311-7.
- BICOCCA, V. T., CHANG, B. H., MASOULEH, B. K., MUSCHEN, M., LORIAUX, M. M., DRUKER, B. J. & TYNER, J. W. 2012. Crosstalk between ROR1 and the Pre-B cell receptor promotes survival of t(1;19) acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*, 22, 656-67.
- BLACKBURN, S. D., SHIN, H., HAINING, W. N., ZOU, T., WORKMAN, C. J., POLLEY, A., BETTS, M. R., FREEMAN, G. J., VIGNALI, D. A. & WHERRY, E. J. 2009. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*, 10, 29-37.
- BRAUMULLER, H., WIEDER, T., BRENNER, E., ASSMANN, S., HAHN, M., ALKHALED, M., SCHILBACH, K., ESSMANN, F., KNEILLING, M., GRIESSINGER, C., RANTA, F., ULLRICH, S., MOCIKAT, R., BRAUNGART, K., MEHRA, T., FEHRENBACHER, B., BERDEL, J., NIESSNER, H., MEIER, F., VAN DEN BROEK, M., HARING, H. U., HANDGRETINGER, R., QUINTANILLA-MARTINEZ, L., FEND, F., PESIC, M., BAUER, J., ZENDER, L., SCHALLER, M., SCHULZE-OSTHOFF, K. & ROCKEN, M. 2013. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, 494, 361-5.
- BRINGOLD, F. & SERRANO, M. 2000. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol*, 35, 317-29.
- BURGI, A., BRODINE, S., WEGNER, S., MILAZZO, M., WALLACE, M. R., SPOONER, K., BLAZES, D. L., AGAN, B. K., ARMSTRONG, A., FRASER, S. & CRUM, N. F. 2005. Incidence and risk factors for the occurrence of non-AIDS-defining cancers among human immunodeficiency virus-infected individuals. *Cancer*, 104, 1505-11.
- BURNET, F. M. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*, 13, 1-27.
- BURNINGHAM, Z., HASHIBE, M., SPECTOR, L. & SCHIFFMAN, J. D. 2012. The epidemiology of sarcoma. *Clin Sarcoma Res*, 2, 14.
- CAMPISI, J. 2013. Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol*, 75, 685-705.

- CAMPISI, J. & D'ADDA DI FAGAGNA, F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 729-40.
- CANDEIAS, S. M. & GAJPL, U. S. 2016. The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 16, 101-7.
- CAO, E., ZANG, X., RAMAGOPAL, U. A., MUKHOPADHAYA, A., FEDOROV, A., FEDOROV, E., ZENCHECK, W. D., LARY, J. W., COLE, J. L., DENG, H., XIAO, H., DILORENZO, T. P., ALLISON, J. P., NATHENSON, S. G. & ALMO, S. C. 2007. T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface. *Immunity*, 26, 311-21.
- CASTELLANOS, J. R., PURVIS, I. J., LABAK, C. M., GUDA, M. R., TSUNG, A. J., VELPULA, K. K. & ASUTHKAR, S. 2017. B7-H3 role in the immune landscape of cancer. *Am J Clin Exp Immunol*, 6, 66-75.
- CATAKOVIC, K., KLIESER, E., NEUREITER, D. & GEISBERGER, R. 2017. T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy. *Cell Commun Signal*, 15, 1.
- CHAPOVAL, A. I., NI, J., LAU, J. S., WILCOX, R. A., FLIES, D. B., LIU, D., DONG, H., SICA, G. L., ZHU, G., TAMADA, K. & CHEN, L. 2001. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat Immunol*, 2, 269-74.
- CHEN, C. H., HUANG, G. T., LEE, H. S., YANG, P. M., YAN, M. D., CHEN, D. S. & SHEU, J. C. 1999. High frequency of expression of MAGE genes in human hepatocellular carcinoma. *Liver*, 19, 110-4.
- CHIBA, S., BAGHDADI, M., AKIBA, H., YOSHIYAMA, H., KINOSHITA, I., DOSAKA-AKITA, H., FUJIOKA, Y., OHBA, Y., GORMAN, J. V., COLGAN, J. D., HIRASHIMA, M., UEDE, T., TAKAOKA, A., YAGITA, H. & JINUSHI, M. 2012. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol*, 13, 832-42.
- COPPE, J. P., KAUSER, K., CAMPISI, J. & BEAUSEJOUR, C. M. 2006. Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J Biol Chem*, 281, 29568-74.
- COPPE, J. P., PATIL, C. K., RODIER, F., SUN, Y., MUNOZ, D. P., GOLDSTEIN, J., NELSON, P. S., DESPREZ, P. Y. & CAMPISI, J. 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, 6, 2853-68.
- COSTA, F. F., LE BLANC, K. & BRODIN, B. 2007. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells*, 25, 707-11.
- COULIE, P. G., VAN DEN EYNDE, B. J., VAN DER BRUGGEN, P. & BOON, T. 2014. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 14, 135-46.
- COVENTON, J. 2017. A review of the mechanism of action and clinical applications of sorafenib in advanced osteosarcoma. *J Bone Oncol*, 8, 4-7.
- CRONWRIGHT, G., LE BLANC, K., GOTHERSTROM, C., DARCY, P., EHNMAN, M. & BRODIN, B. 2005. Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell

- migration and matrix metalloproteinase 2 expression. *Cancer Res*, 65, 2207-15.
- D'ANGELO, S. P. 2016. Manipulating the Immune System With Checkpoint Inhibitors for Patients With Metastatic Sarcoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 35, e558-64.
- D'ANGELO, S. P., SHOUSHARI, A. N., AGARAM, N. P., KUK, D., QIN, L. X., CARVAJAL, R. D., DICKSON, M. A., GOUNDER, M., KEOHAN, M. L., SCHWARTZ, G. K. & TAP, W. D. 2015. Prevalence of tumor-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in the soft tissue sarcoma microenvironment. *Hum Pathol*, 46, 357-65.
- D'ANGELO, S. P., SHOUSHARI, A. N., KEOHAN, M. L., DICKSON, M. A., GOUNDER, M. M., CHI, P., LOO, J. K., GAFFNEY, L., SCHNEIDER, L., PATEL, Z., ERINJERI, J. P., BLUTH, M. J., SJOBERG, A., STREICHER, H., TAKEBE, N., QIN, L. X., ANTONESCU, C., DEMATTEO, R. P., CARVAJAL, R. D. & TAP, W. D. 2017. Combined KIT and CTLA-4 Blockade in Patients with Refractory GIST and Other Advanced Sarcomas: A Phase Ib Study of Dasatinib plus Ipilimumab. *Clin Cancer Res*, 23, 2972-2980.
- D'ERRICO, G., MACHADO, H. L. & SAINZ, B., JR. 2017. A current perspective on cancer immune therapy: step-by-step approach to constructing the magic bullet. *Clin Transl Med*, 6, 3.
- DASGUPTA, S. & KUMAR, V. 2016. Type II NKT cells: a distinct CD1d-restricted immune regulatory NKT cell subset. *Immunogenetics*, 68, 665-76.
- DAVE, H., ANVER, M. R., BUTCHER, D. O., BROWN, P., KHAN, J., WAYNE, A. S., BASKAR, S. & RADER, C. 2012. Restricted cell surface expression of receptor tyrosine kinase ROR1 in pediatric B-lineage acute lymphoblastic leukemia suggests targetability with therapeutic monoclonal antibodies. *PLoS One*, 7, e52655.
- DAWSON, M. A. & KOUZARIDES, T. 2012. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, 150, 12-27.
- DE MAGALHAES, J. P. & PASSOS, J. F. 2018. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mech Ageing Dev*, 170, 2-9.
- DELATTRE, O., ZUCMAN, J., MELOT, T., GARAU, X. S., ZUCKER, J. M., LENOIR, G. M., AMBROS, P. F., SHEER, D., TURC-CAREL, C., TRICHE, T. J. & ET AL. 1994. The Ewing family of tumors--a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med*, 331, 294-9.
- DHODAPKAR, M. V. & KUMAR, V. 2017. Type II NKT Cells and Their Emerging Role in Health and Disease. *J Immunol*, 198, 1015-1021.
- DOWNING, J. R., HEAD, D. R., PARHAM, D. M., DOUGLASS, E. C., HULSHOF, M. G., LINK, M. P., MOTRONI, T. A., GRIER, H. E., CURCIO-BRINT, A. M. & SHAPIRO, D. N. 1993. Detection of the (11;22)(q24;q12) translocation of Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor by reverse transcription polymerase chain reaction. *Am J Pathol*, 143, 1294-300.
- DUNN, G. P., BRUCE, A. T., IKEDA, H., OLD, L. J. & SCHREIBER, R. D. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3, 991-8.

- DYCK, L. & MILLS, K. H. G. 2017. Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases. *Eur J Immunol*, 47, 765-779.
- EWING, J. 1972. Classics in oncology. Diffuse endothelioma of bone. James Ewing. Proceedings of the New York Pathological Society, 1921. *CA Cancer J Clin*, 22, 95-8.
- FEINBERG, A. P., KOLDOBSKIY, M. A. & GONDOR, A. 2016. Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nat Rev Genet*, 17, 284-99.
- FENAUX, P., MUFTI, G. J., HELLSTROM-LINDBERG, E., SANTINI, V., FINELLI, C., GIAGOUNIDIS, A., SCHOCH, R., GATTERMANN, N., SANZ, G., LIST, A., GORE, S. D., SEYMOUR, J. F., BENNETT, J. M., BYRD, J., BACKSTROM, J., ZIMMERMAN, L., MCKENZIE, D., BEACH, C. & SILVERMAN, L. R. 2009. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*, 10, 223-32.
- FERREIRA, C., BARTHLOTT, T., GARCIA, S., ZAMOYSKA, R. & STOCKINGER, B. 2000. Differential survival of naive CD4 and CD8 T cells. *J Immunol*, 165, 3689-94.
- FOURCADE, J., SUN, Z., BENALLAOUA, M., GUILLAUME, P., LUESCHER, I. F., SANDER, C., KIRKWOOD, J. M., KUCHROO, V. & ZAROOUR, H. M. 2010. Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med*, 207, 2175-86.
- FRANK, J. A., RANFT, A., PAULUSSEN, M., JUERGENS, H., KRUSEOVA, J., BAUER, S., NIGGLI, F., REICHARDT, P. & DIRKSEN, U. 2017. Results for patients with sarcoma not otherwise specified and other diagnoses than Ewing sarcoma treated according to the Euro-EWING 99 trial. *Pediatr Blood Cancer*, 64.
- FRATTA, E., CORAL, S., COVRE, A., PARISI, G., COLIZZI, F., DANIELLI, R., NICOLAY, H. J., SIGALOTTI, L. & MAIO, M. 2011. The biology of cancer testis antigens: putative function, regulation and therapeutic potential. *Mol Oncol*, 5, 164-82.
- FREEMAN, G. J., LONG, A. J., IWAI, Y., BOURQUE, K., CHERNOVA, T., NISHIMURA, H., FITZ, L. J., MALENKOVICH, N., OKAZAKI, T., BYRNE, M. C., HORTON, H. F., FOUSER, L., CARTER, L., LING, V., BOWMAN, M. R., CARRENO, B. M., COLLINS, M., WOOD, C. R. & HONJO, T. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, 192, 1027-34.
- FUKUDA, T., CHEN, L., ENDO, T., TANG, L., LU, D., CASTRO, J. E., WIDHOPF, G. F., 2ND, RASSENTI, L. Z., CANTWELL, M. J., PRUSSAK, C. E., CARSON, D. A. & KIPPS, T. J. 2008. Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 3047-52.
- GAO, X., ZHU, Y., LI, G., HUANG, H., ZHANG, G., WANG, F., SUN, J., YANG, Q., ZHANG, X. & LU, B. 2012. TIM-3 expression characterizes regulatory

- T cells in tumor tissues and is associated with lung cancer progression. *PLoS One*, 7, e30676.
- GAUGLER, B., VAN DEN EYNDE, B., VAN DER BRUGGEN, P., ROMERO, P., GAFORIO, J. J., DE PLAEN, E., LETHE, B., BRASSEUR, F. & BOON, T. 1994. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med*, 179, 921-30.
- GINSBERG, J. P., DE ALAVA, E., LADANYI, M., WEXLER, L. H., KOVAR, H., PAULUSSEN, M., ZOUBEK, A., DOCKHORN-DWORNICZAK, B., JUERGENS, H., WUNDER, J. S., ANDRULIS, I. L., MALIK, R., SORENSEN, P. H., WOMER, R. B. & BARR, F. G. 1999. EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing's sarcoma. *J Clin Oncol*, 17, 1809-14.
- GJERSTORFF, M. F., HARKNESS, L., KASSEM, M., FRANDSEN, U., NIELSEN, O., LUTTERODT, M., MOLLGARD, K. & DITZEL, H. J. 2008. Distinct GAGE and MAGE-A expression during early human development indicate specific roles in lineage differentiation. *Hum Reprod*, 23, 2194-201.
- GREEN, J., NUSSE, R. & VAN AMERONGEN, R. 2014. The role of Ryk and Ror receptor tyrosine kinases in Wnt signal transduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6.
- GREENBERG, P. D., REUSSER, P., GOODRICH, J. M. & RIDDELL, S. R. 1991. Development of a treatment regimen for human cytomegalovirus (CMV) infection in bone marrow transplantation recipients by adoptive transfer of donor-derived CMV-specific T cell clones expanded in vitro. *Ann N Y Acad Sci*, 636, 184-95.
- GRIER, H. E., KRAILO, M. D., TARBELL, N. J., LINK, M. P., FRYER, C. J., PRITCHARD, D. J., GEBHARDT, M. C., DICKMAN, P. S., PERLMAN, E. J., MEYERS, P. A., DONALDSON, S. S., MOORE, S., RAUSEN, A. R., VIETTI, T. J. & MISER, J. S. 2003. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med*, 348, 694-701.
- GUBIN, M. M., ARTYOMOV, M. N., MARDIS, E. R. & SCHREIBER, R. D. 2015. Tumor neoantigens: building a framework for personalized cancer immunotherapy. *J Clin Invest*, 125, 3413-21.
- HASAN, M. K., RASSENTI, L., WIDHOPF, G. F., 2ND, YU, J. & KIPPS, T. J. 2019. Wnt5a causes ROR1 to complex and activate cortactin to enhance migration of chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, 33, 653-661.
- HERMAN, J. G. & BAYLIN, S. B. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 349, 2042-54.
- HERMES, N., KEWITZ, S. & STAEGE, M. S. 2016. Preferentially Expressed Antigen in Melanoma (PRAME) and the PRAME Family of Leucine-Rich Repeat Proteins. *Curr Cancer Drug Targets*, 16, 400-14.
- HODI, F. S., CHIARION-SILENI, V., GONZALEZ, R., GROB, J. J., RUTKOWSKI, P., COWEY, C. L., LAO, C. D., SCHADENDORF, D., WAGSTAFF, J., DUMMER, R., FERRUCCI, P. F., SMYLLIE, M., HILL, A., HOGG, D., MARQUEZ-RODAS, I., JIANG, J., RIZZO, J., LARKIN, J. & WOLCHOK, J. D. 2018. Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus

- ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 19, 1480-1492.
- HOFMEYER, K. A., RAY, A. & ZANG, X. 2008. The contrasting role of B7-H3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10277-8.
- HOJJAT-FARSANGI, M., MOSHFEGH, A., DANESHMANESH, A. H., KHAN, A. S., MIKAELSSON, E., OSTERBORG, A. & MELLSTEDT, H. 2014. The receptor tyrosine kinase ROR1--an oncofetal antigen for targeted cancer therapy. *Semin Cancer Biol*, 29, 21-31.
- HUANG, X., PARK, H., GREENE, J., PAO, J., MULVEY, E., ZHOU, S. X., ALBERT, C. M., MOY, F., SACHDEV, D., YEE, D., RADER, C., HAMBY, C. V., LOEB, D. M., CAIRO, M. S. & ZHOU, X. 2015a. IGF1R- and ROR1-Specific CAR T Cells as a Potential Therapy for High Risk Sarcomas. *PLoS One*, 10, e0133152.
- HUANG, Y. H., ZHU, C., KONDO, Y., ANDERSON, A. C., GANDHI, A., RUSSELL, A., DOUGAN, S. K., PETERSEN, B. S., MELUM, E., PERTEL, T., CLAYTON, K. L., RAAB, M., CHEN, Q., BEAUCHEMIN, N., YAZAKI, P. J., PYZIK, M., OSTROWSKI, M. A., GLICKMAN, J. N., RUDD, C. E., PLOEGH, H. L., FRANKE, A., PETSKO, G. A., KUCHROO, V. K. & BLUMBERG, R. S. 2015b. CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature*, 517, 386-90.
- HUNG, K., HAYASHI, R., LAFOND-WALKER, A., LOWENSTEIN, C., PARDOLL, D. & LEVITSKY, H. 1998. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med*, 188, 2357-68.
- HUTCHISON, S. & PRITCHARD, A. L. 2018. Identifying neoantigens for use in immunotherapy. *Mamm Genome*, 29, 714-730.
- ILLINGWORTH, R. S. & BIRD, A. P. 2009. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett*, 583, 1713-20.
- JOFFRE, O. P., SEGURA, E., SAVINA, A. & AMIGORENA, S. 2012. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, 12, 557-69.
- JONES, P. A. & BAYLIN, S. B. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3, 415-28.
- JONES, P. A., OHTANI, H., CHAKRAVARTHY, A. & DE CARVALHO, D. D. 2019. Epigenetic therapy in immune-oncology. *Nat Rev Cancer*, 19, 151-161.
- KAKIMI, K., MATSUSHITA, H., HOSOI, A., MIYAI, M. & OHARA, O. 2015. CTLs regulate tumor growth via cytostatic effects rather than cytotoxicity: a few T cells can influence the growth of many times more tumor cells. *Oncoimmunology*, 4, e970464.
- KALOS, M. & JUNE, C. H. 2013. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. *Immunity*, 39, 49-60.
- KANSARA, M., TENG, M. W., SMYTH, M. J. & THOMAS, D. M. 2014. Translational biology of osteosarcoma. *Nat Rev Cancer*, 14, 722-35.
- KANTARJIAN, H., OKI, Y., GARCIA-MANERO, G., HUANG, X., O'BRIEN, S., CORTES, J., FADERL, S., BUESO-RAMOS, C., RAVANDI, F., ESTROV, Z., FERRAJOLI, A., WIERDA, W., SHAN, J., DAVIS, J., GILES, F., SABA, H. I. & ISSA, J. P. 2007. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*, 109, 52-7.

- KARVONEN, H., PERTTILA, R., NIININEN, W., BARKER, H. & UNGUREANU, D. 2018. Targeting Wnt signaling pseudokinases in hematological cancers. *Eur J Haematol*, 101, 457-465.
- KAYSER, S., BOBETA, C., FEUCHT, J., WITTE, K. E., SCHEU, A., BULOW, H. J., JOACHIM, S., STEVANOVIC, S., SCHUMM, M., RITTIG, S. M., LANG, P., ROCKEN, M., HANDGRETINGER, R. & FEUCHTINGER, T. 2015. Rapid generation of NY-ESO-1-specific CD4(+) THELPER1 cells for adoptive T-cell therapy. *Oncoimmunology*, 4, e1002723.
- KELLY-ROGERS, J., MADRIGAL-ESTEBAS, L., O'CONNOR, T. & DOHERTY, D. G. 2006. Activation-induced expression of CD56 by T cells is associated with a reprogramming of cytolytic activity and cytokine secretion profile in vitro. *Hum Immunol*, 67, 863-73.
- KILPATRICK, S. E., REITH, J. D. & RUBIN, B. 2018. Ewing Sarcoma and the History of Similar and Possibly Related Small Round Cell Tumors: From Whence Have We Come and Where are We Going? *Adv Anat Pathol*, 25, 314-326.
- KIM, J. A. & YEOM, Y. I. 2018. Metabolic Signaling to Epigenetic Alterations in Cancer. *Biomol Ther (Seoul)*, 26, 69-80.
- KLOSE, R. J. & BIRD, A. P. 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*, 31, 89-97.
- KNUTSON, K. L. & DISIS, M. L. 2005. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, 54, 721-8.
- KOIRALA, P., ROTH, M. E., GILL, J., PIPERDI, S., CHINAI, J. M., GELLER, D. S., HOANG, B. H., PARK, A., FREMED, M. A., ZANG, X. & GORLICK, R. 2016. Immune infiltration and PD-L1 expression in the tumor microenvironment are prognostic in osteosarcoma. *Sci Rep*, 6, 30093.
- KONDO, T., ZHU, X., ASA, S. L. & EZZAT, S. 2007. The cancer/testis antigen melanoma-associated antigen-A3/A6 is a novel target of fibroblast growth factor receptor 2-IIIb through histone H3 modifications in thyroid cancer. *Clin Cancer Res*, 13, 4713-20.
- KRIDIS, W. B., TOUMI, N., CHAARI, H., KHANFIR, A., AYADI, K., KESKES, H., BOUDAWARA, T., DAOUD, J. & FRIKHA, M. 2017. A Review of Ewing Sarcoma Treatment: Is it Still a Subject of Debate? *Rev Recent Clin Trials*, 12, 19-23.
- KRISHNADAS, D. K., BAO, L., BAI, F., CHENCHERI, S. C. & LUCAS, K. 2014. Decitabine facilitates immune recognition of sarcoma cells by upregulating CT antigens, MHC molecules, and ICAM-1. *Tumour Biol*, 35, 5753-62.
- KRTOLICA, A., PARRINELLO, S., LOCKETT, S., DESPREZ, P. Y. & CAMPISI, J. 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 12072-7.
- KURTS, C., ROBINSON, B. W. & KNOLLE, P. A. 2010. Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 10, 403-14.
- LE, D. T., DURHAM, J. N., SMITH, K. N., WANG, H., BARTLETT, B. R., AULAKH, L. K., LU, S., KEMBERLING, H., WILT, C., LUBER, B. S., WONG, F., AZAD, N. S., RUCKI, A. A., LAHERU, D., DONEHOWER, R., ZAHEER, A., FISHER, G. A., CROCENZI, T. S., LEE, J. J., GRETEN, T.

- F., DUFFY, A. G., CIOMBOR, K. K., EYRING, A. D., LAM, B. H., JOE, A., KANG, S. P., HOLDHOFF, M., DANILOVA, L., COPE, L., MEYER, C., ZHOU, S., GOLDBERG, R. M., ARMSTRONG, D. K., BEVER, K. M., FADER, A. N., TAUBE, J., HOUSSEAU, F., SPETZLER, D., XIAO, N., PARDOLL, D. M., PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W., ESHLEMAN, J. R., VOGELSTEIN, B., ANDERS, R. A. & DIAZ, L. A., JR. 2017. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*, 357, 409-413.
- LE MIRE, L., HOLLOWOOD, K., GRAY, D., BORDEA, C. & WOJNAROWSKA, F. 2006. Melanomas in renal transplant recipients. *Br J Dermatol*, 154, 472-7.
- LEACH, D. R., KRUMMEL, M. F. & ALLISON, J. P. 1996. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271, 1734-6.
- LEVINE, A. M. 1993. AIDS-related malignancies: the emerging epidemic. *J Natl Cancer Inst*, 85, 1382-97.
- LI, P., HARRIS, D., LIU, Z., LIU, J., KEATING, M. & ESTROV, Z. 2010. Stat3 activates the receptor tyrosine kinase like orphan receptor-1 gene in chronic lymphocytic leukemia cells. *PLoS One*, 5, e11859.
- LIM, J. H., KIM, S. P., GABRIELSON, E., PARK, Y. B., PARK, J. W. & KWON, T. K. 2005. Activation of human cancer/testis antigen gene, XAGE-1, in tumor cells is correlated with CpG island hypomethylation. *Int J Cancer*, 116, 200-6.
- LINK, M. P., GOORIN, A. M., MISER, A. W., GREEN, A. A., PRATT, C. B., BELASCO, J. B., PRITCHARD, J., MALPAS, J. S., BAKER, A. R., KIRKPATRICK, J. A. & ET AL. 1986. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N Engl J Med*, 314, 1600-6.
- LIU, W., CHENG, S., ASA, S. L. & EZZAT, S. 2008. The melanoma-associated antigen A3 mediates fibronectin-controlled cancer progression and metastasis. *Cancer Res*, 68, 8104-12.
- LLOSA, N. J., CRUISE, M., TAM, A., WICKS, E. C., HECHENBLEIKNER, E. M., TAUBE, J. M., BLOSSER, R. L., FAN, H., WANG, H., LUBER, B. S., ZHANG, M., PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B., SEARS, C. L., ANDERS, R. A., PARDOLL, D. M. & HOUSSEAU, F. 2015. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov*, 5, 43-51.
- LUCAS, S. & COULIE, P. G. 2008. About human tumor antigens to be used in immunotherapy. *Semin Immunol*, 20, 301-7.
- LUETKE, A., MEYERS, P. A., LEWIS, I. & JUERGENS, H. 2014. Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treat Rev*, 40, 523-32.
- MAHNKE, Y. D., BRODIE, T. M., SALLUSTO, F., ROEDERER, M. & LUGLI, E. 2013. The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol*, 43, 2797-809.
- MAI, A. & ALTUCCI, L. 2009. Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 199-213.

- MATKO, S., MANDERLA, J., BONSAK, M., SCHMITZ, M., BORNHAUSER, M., TONN, T. & ODENDAHL, M. 2018. PRAME peptide-specific CD8(+) T cells represent the predominant response against leukemia-associated antigens in healthy individuals. *Eur J Immunol*, 48, 1400-1411.
- MATSUZAKI, J., GNJATIC, S., MHAWECH-FAUCEGLIA, P., BECK, A., MILLER, A., TSUJI, T., EPPOLITO, C., QIAN, F., LELE, S., SHRIKANT, P., OLD, L. J. & ODUNSI, K. 2010. Tumor-infiltrating NY-ESO-1-specific CD8+ T cells are negatively regulated by LAG-3 and PD-1 in human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 7875-80.
- MCCARTHY, E. F. 2006. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J*, 26, 154-8.
- MEEK, D. W. & MARCAR, L. 2012. MAGE-A antigens as targets in tumour therapy. *Cancer Lett*, 324, 126-32.
- MEEUSEN, E., LIM, E. & MATHIVANAN, S. 2017. Secreted Tumor Antigens - Immune Biomarkers for Diagnosis and Therapy. *Proteomics*, 17.
- MERCHANT, M. S., BERNSTEIN, D., AMOAKO, M., BAIRD, K., FLEISHER, T. A., MORRE, M., STEINBERG, S. M., SABATINO, M., STRONCEK, D. F., VENKATASAN, A. M., WOOD, B. J., WRIGHT, M., ZHANG, H. & MACKALL, C. L. 2016a. Adjuvant Immunotherapy to Improve Outcome in High-Risk Pediatric Sarcomas. *Clin Cancer Res*, 22, 3182-91.
- MERCHANT, M. S., WRIGHT, M., BAIRD, K., WEXLER, L. H., RODRIGUEZ-GALINDO, C., BERNSTEIN, D., DELBROOK, C., LODISH, M., BISHOP, R., WOLCHOK, J. D., STREICHER, H. & MACKALL, C. L. 2016b. Phase I Clinical Trial of Ipilimumab in Pediatric Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res*, 22, 1364-70.
- MEYERS, P. A. 2015. Systemic therapy for osteosarcoma and Ewing sarcoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, e644-7.
- MEYERS, P. A., HEALEY, J. H., CHOU, A. J., WEXLER, L. H., MEROLA, P. R., MORRIS, C. D., LAQUAGLIA, M. P., KELLICK, M. G., ABRAMSON, S. J. & GORLICK, R. 2011. Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma. *Cancer*, 117, 1736-44.
- MEYERS, P. A., SCHWARTZ, C. L., KRAILO, M. D., HEALEY, J. H., BERNSTEIN, M. L., BETCHER, D., FERGUSON, W. S., GEBHARDT, M. C., GOORIN, A. M., HARRIS, M., KLEINERMAN, E., LINK, M. P., NADEL, H., NIEDER, M., SIEGAL, G. P., WEINER, M. A., WELLS, R. J., WOMER, R. B. & GRIER, H. E. 2008. Osteosarcoma: the addition of muramyl tripeptide to chemotherapy improves overall survival--a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*, 26, 633-8.
- MIRABELLO, L., TROISI, R. J. & SAVAGE, S. A. 2009a. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int J Cancer*, 125, 229-34.
- MIRABELLO, L., TROISI, R. J. & SAVAGE, S. A. 2009b. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer*, 115, 1531-43.
- MITTAL, D., GUBIN, M. M., SCHREIBER, R. D. & SMYTH, M. J. 2014. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*, 27, 16-25.

- MOHAMED, Y. S., BASHAWRI, L. A., VATTE, C., ABU-RISH, E. Y., CYRUS, C., KHALAF, W. S. & BROWNING, M. J. 2016. The in vitro generation of multi-tumor antigen-specific cytotoxic T cell clones: Candidates for leukemia adoptive immunotherapy following allogeneic stem cell transplantation. *Mol Immunol*, 77, 79-88.
- MOHAMMAD, H. P., BARBASH, O. & CREASY, C. L. 2019. Targeting epigenetic modifications in cancer therapy: erasing the roadmap to cancer. *Nat Med*, 25, 403-418.
- MULLER-HERMELINK, N., BRAUMULLER, H., PICHLER, B., WIEDER, T., MAILHAMMER, R., SCHAAK, K., GHORESCHI, K., YAZDI, A., HAUBNER, R., SANDER, C. A., MOCIKAT, R., SCHWAIGER, M., FORSTER, I., HUSS, R., WEBER, W. A., KNEILLING, M. & ROCKEN, M. 2008. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell*, 13, 507-18.
- NAKAYAMADA, S., TAKAHASHI, H., KANNO, Y. & O'SHEA, J. J. 2012. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr Opin Immunol*, 24, 297-302.
- NATHENSON, M. J., CONLEY, A. P. & SAUSVILLE, E. 2018. Immunotherapy: A New (and Old) Approach to Treatment of Soft Tissue and Bone Sarcomas. *Oncologist*, 23, 71-83.
- NOVELLINO, L., CASTELLI, C. & PARMIANI, G. 2005. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother*, 54, 187-207.
- PARDOLL, D. 2015. Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention. *Semin Oncol*, 42, 523-38.
- PARDOLL, D. & DRAKE, C. 2012. Immunotherapy earns its spot in the ranks of cancer therapy. *J Exp Med*, 209, 201-9.
- PARDOLL, D. M. 2012. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12, 252-64.
- PARDOLL, D. M. & TOPALIAN, S. L. 1998. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol*, 10, 588-94.
- PARK, J. H., KONG, G. H. & LEE, S. W. 2002. hMAGE-A1 overexpression reduces TNF-alpha cytotoxicity in ME-180 cells. *Mol Cells*, 14, 122-9.
- PARKIN, D. M., STILLER, C. A. & NECTOUX, J. 1993. International variations in the incidence of childhood bone tumours. *Int J Cancer*, 53, 371-6.
- PAUKEN, K. E. & WHERRY, E. J. 2015. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol*, 36, 265-76.
- PEREZ-DIEZ, A., JONCKER, N. T., CHOI, K., CHAN, W. F., ANDERSON, C. C., LANTZ, O. & MATZINGER, P. 2007. CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells. *Blood*, 109, 5346-54.
- PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- PIPERNO-NEUMANN, S., LE DELEY, M. C., REDINI, F., PACQUEMENT, H., MAREC-BERARD, P., PETIT, P., BRISSE, H., LERVAT, C., GENTET, J. C., ENTZ-WERLE, N., ITALIANO, A., CORRADINI, N., BOMPAS, E., PENEL, N., TABONE, M. D., GOMEZ-BROUCHET, A., GUINEBRETIERE, J. M., MASCARD, E., GOUIN, F., CHEVANCE, A., BONNET, N., BLAY, J. Y. & BRUGIERES, L. 2016. Zoledronate in

- combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 17, 1070-1080.
- PLOEGH, H. L. 1998. Viral strategies of immune evasion. *Science*, 280, 248-53.
- POTRATZ, J., TILLMANN, A., BERNING, P., KORSCHING, E., SCHAEFER, C., LECHTAPE, B., SCHLEITHOFF, C., UNLAND, R., SCHAFER, K. L., MULLER-TIDOW, C., JURGENS, H. & DIRKSEN, U. 2016. Receptor tyrosine kinase gene expression profiles of Ewing sarcomas reveal ROR1 as a potential therapeutic target in metastatic disease. *Mol Oncol*, 10, 677-92.
- PRESTWICH, R. J., ERRINGTON, F., HATFIELD, P., MERRICK, A. E., ILETT, E. J., SELBY, P. J. & MELCHER, A. A. 2008. The immune system--is it relevant to cancer development, progression and treatment? *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 20, 101-12.
- PRZYBYLA, A., ZHANG, T., LI, R., ROEN, D. R., MACKIEWICZ, A. & LEHMANN, P. V. 2019. Natural T cell autoreactivity to melanoma antigens: clonally expanded melanoma-antigen specific CD8 + memory T cells can be detected in healthy humans. *Cancer Immunol Immunother*, 68, 709-720.
- QIN, Y. Z., ZHANG, Y. H., QIN, X. Y. & ZHU, H. H. 2017. Methylation pattern of preferentially expressed antigen of melanoma in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Oncol Lett*, 13, 2823-2830.
- RATEL, D., RAVANAT, J. L., CHARLES, M. P., PLATET, N., BREUILLAUD, L., LUNARDI, J., BERGER, F. & WION, D. 2006. Undetectable levels of N6-methyl adenine in mouse DNA: Cloning and analysis of PRED28, a gene coding for a putative mammalian DNA adenine methyltransferase. *FEBS Lett*, 580, 3179-84.
- REBAGAY, G., YAN, S., LIU, C. & CHEUNG, N. K. 2012. ROR1 and ROR2 in Human Malignancies: Potentials for Targeted Therapy. *Front Oncol*, 2, 34.
- RESTIFO, N. P., DUDLEY, M. E. & ROSENBERG, S. A. 2012. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol*, 12, 269-81.
- RESTIFO, N. P., ESQUIVEL, F., KAWAKAMI, Y., YEWDELL, J. W., MULE, J. J., ROSENBERG, S. A. & BENNINK, J. R. 1993. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med*, 177, 265-72.
- ROBBINS, P. F., EL-GAMIL, M., LI, Y. F., KAWAKAMI, Y., LOFTUS, D., APPELLA, E. & ROSENBERG, S. A. 1996. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med*, 183, 1185-92.
- ROBERTS, S. S., CHOU, A. J. & CHEUNG, N. K. 2015. Immunotherapy of Childhood Sarcomas. *Front Oncol*, 5, 181.
- ROSENBERG, S. A. & RESTIFO, N. P. 2015. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, 348, 62-8.
- ROSENBERG, S. A., YANG, J. C., SHERRY, R. M., KAMMULA, U. S., HUGHES, M. S., PHAN, G. Q., CITRIN, D. E., RESTIFO, N. P., ROBBINS, P. F., WUNDERLICH, J. R., MORTON, K. E., LAURENCOT, C. M., STEINBERG, S. M., WHITE, D. E. & DUDLEY, M. E. 2011. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic

- melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 17, 4550-7.
- ROWSHANRAVAN, B., HALLIDAY, N. & SANSOM, D. M. 2018. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood*, 131, 58-67.
- RUELLA, M. & KALOS, M. 2014. Adoptive immunotherapy for cancer. *Immunol Rev*, 257, 14-38.
- RUTER, B., WIJERMANS, P. W. & LUBBERT, M. 2004. DNA methylation as a therapeutic target in hematologic disorders: recent results in older patients with myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Int J Hematol*, 80, 128-35.
- SALEH, M. H., WANG, L. & GOLDBERG, M. S. 2016. Improving cancer immunotherapy with DNA methyltransferase inhibitors. *Cancer Immunol Immunother*, 65, 787-96.
- SANCHEZ-PAULETE, A. R., TEIJEIRA, A., CUETO, F. J., GARASA, S., PEREZ-GRACIA, J. L., SANCHEZ-ARRAEZ, A., SANCHO, D. & MELERO, I. 2017. Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy. *Ann Oncol*, 28, xii44-xii55.
- SANTIAGO, C., BALLESTEROS, A., MARTINEZ-MUNOZ, L., MELLADO, M., KAPLAN, G. G., FREEMAN, G. J. & CASASNOVAS, J. M. 2007a. Structures of T cell immunoglobulin mucin protein 4 show a metal-ion-dependent ligand binding site where phosphatidylserine binds. *Immunity*, 27, 941-51.
- SANTIAGO, C., BALLESTEROS, A., TAMI, C., MARTINEZ-MUNOZ, L., KAPLAN, G. G. & CASASNOVAS, J. M. 2007b. Structures of T Cell immunoglobulin mucin receptors 1 and 2 reveal mechanisms for regulation of immune responses by the TIM receptor family. *Immunity*, 26, 299-310.
- SAPEGA, O., MIKYSKOVA, R., BIEBLOVA, J., MRAZKOVA, B., HODNY, Z. & REINIS, M. 2018. Distinct phenotypes and 'bystander' effects of senescent tumour cells induced by docetaxel or immunomodulatory cytokines. *Int J Oncol*, 53, 1997-2009.
- SCANLAN, M. J., ALTORKI, N. K., GURE, A. O., WILLIAMSON, B., JUNGBLUTH, A., CHEN, Y. T. & OLD, L. J. 2000. Expression of cancer-testis antigens in lung cancer: definition of bromodomain testis-specific gene (BRDT) as a new CT gene, CT9. *Cancer Lett*, 150, 155-64.
- SCANLAN, M. J., SIMPSON, A. J. & OLD, L. J. 2004. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun*, 4, 1.
- SCHADENDORF, D., HODI, F. S., ROBERT, C., WEBER, J. S., MARGOLIN, K., HAMID, O., PATT, D., CHEN, T. T., BERMAN, D. M. & WOLCHOK, J. D. 2015. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol*, 33, 1889-94.
- SCHREIBER, R. D., OLD, L. J. & SMYTH, M. J. 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331, 1565-70.
- SHARMA, P. & ALLISON, J. P. 2015. Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential. *Cell*, 161, 205-14.

- SHARMA, P., SHEN, Y., WEN, S., YAMADA, S., JUNGBLUTH, A. A., GNJATIC, S., BAJORIN, D. F., REUTER, V. E., HERR, H., OLD, L. J. & SATO, E. 2007. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 3967-72.
- SHIMOSE, S., KUBO, T., FUJIMORI, J., FURUTA, T. & OCHI, M. 2014. A novel assessment method of serum alkaline phosphatase for the diagnosis of osteosarcoma in children and adolescents. *J Orthop Sci*, 19, 997-1003.
- SHORE, N. D. 2015. Advances in the understanding of cancer immunotherapy. *BJU Int*, 116, 321-9.
- SIGALOTTI, L., CORAL, S., FRATTA, E., LAMAJ, E., DANIELLI, R., DI GIACOMO, A. M., ALTOMONTE, M. & MAIO, M. 2005. Epigenetic modulation of solid tumors as a novel approach for cancer immunotherapy. *Semin Oncol*, 32, 473-8.
- SIMPSON, A. J., CABALLERO, O. L., JUNGBLUTH, A., CHEN, Y. T. & OLD, L. J. 2005. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer*, 5, 615-25.
- SIMPSON, E. & BROWN, H. L. 2018. Understanding osteosarcomas. *Jaapa*, 31, 15-19.
- SMELAND, S., BIELACK, S. S., WHELAN, J., BERNSTEIN, M., HOGENDOORN, P., KRAILO, M. D., GORLICK, R., JANEWAY, K. A., INGLEBY, F. C., ANNINGA, J., ANTAL, I., ARNDT, C., BROWN, K. L. B., BUTTERFASS-BAHLOUL, T., CALAMINUS, G., CAPRA, M., DHOOGHE, C., ERIKSSON, M., FLANAGAN, A. M., FRIEDEL, G., GEBHARDT, M. C., GELDERBLUM, H., GOLDSBY, R., GRIER, H. E., GRIMER, R., HAWKINS, D. S., HECKER-NOLTING, S., SUNDBY HALL, K., ISAKOFF, M. S., JOVIC, G., KUHNE, T., KAGER, L., VON KALLE, T., KABICKOVA, E., LANG, S., LAU, C. C., LEAVEY, P. J., LESSNICK, S. L., MASCARENHAS, L., MAYER-STEINACKER, R., MEYERS, P. A., NAGARAJAN, R., RANDALL, R. L., REICHARDT, P., RENARD, M., RECHNITZER, C., SCHWARTZ, C. L., STRAUSS, S., TEOT, L., TIMMERMANN, B., SYDES, M. R. & MARINA, N. 2019. Survival and prognosis with osteosarcoma: outcomes in more than 2000 patients in the EURAMOS-1 (European and American Osteosarcoma Study) cohort. *Eur J Cancer*, 109, 36-50.
- SREEKANTIAH, C., LADANYI, M., RODRIGUEZ, E. & CHAGANTI, R. S. 1994. Chromosomal aberrations in soft tissue tumors. Relevance to diagnosis, classification, and molecular mechanisms. *Am J Pathol*, 144, 1121-34.
- STEIMLE, V., SIEGRIST, C. A., MOTTET, A., LISOWSKA-GROSPIERRE, B. & MACH, B. 1994. Regulation of MHC class II expression by interferon-gamma mediated by the transactivator gene CIITA. *Science*, 265, 106-9.
- STEINMAN, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, 9, 271-96.
- STREBHARDT, K. & ULLRICH, A. 2008. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nat Rev Cancer*, 8, 473-80.
- SUN, M., RICHARDS, S., PRASAD, D. V., MAI, X. M., RUDENSKY, A. & DONG, C. 2002. Characterization of mouse and human B7-H3 genes. *J Immunol*, 168, 6294-7.

- SUN, Y., URQUIDI, V. & GOODISON, S. 2010. Derivation of molecular signatures for breast cancer recurrence prediction using a two-way validation approach. *Breast Cancer Res Treat*, 119, 593-9.
- TABY, R. & ISSA, J. P. 2010. Cancer epigenetics. *CA Cancer J Clin*, 60, 376-92.
- TAN, J., CHEN, S., HUANG, J., CHEN, Y., YANG, L., WANG, C., ZHONG, J., LU, Y., WANG, L., ZHU, K. & LI, Y. 2018. Increased exhausted CD8(+) T cells with programmed death-1, T-cell immunoglobulin and mucin-domain-containing-3 phenotype in patients with multiple myeloma. *Asia Pac J Clin Oncol*, 14, e266-e274.
- TAWBI, H. A., BURGESS, M., BOLEJACK, V., VAN TINE, B. A., SCHUETZE, S. M., HU, J., D'ANGELO, S., ATTIA, S., RIEDEL, R. F., PRIEBAT, D. A., MOVVA, S., DAVIS, L. E., OKUNO, S. H., REED, D. R., CROWLEY, J., BUTTERFIELD, L. H., SALAZAR, R., RODRIGUEZ-CANALES, J., LAZAR, A. J., WISTUBA, II, BAKER, L. H., MAKI, R. G., REINKE, D. & PATEL, S. 2017. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 18, 1493-1501.
- TENG, M. W., SWANN, J. B., KOEBEL, C. M., SCHREIBER, R. D. & SMYTH, M. J. 2008. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol*, 84, 988-93.
- TOPALIAN, S. L. 2017. Targeting Immune Checkpoints in Cancer Therapy. *Jama*, 318, 1647-1648.
- TOPALIAN, S. L., DRAKE, C. G. & PARDOLL, D. M. 2012a. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*, 24, 207-12.
- TOPALIAN, S. L., DRAKE, C. G. & PARDOLL, D. M. 2015. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, 27, 450-61.
- TOPALIAN, S. L., HODI, F. S., BRAHMER, J. R., GETTINGER, S. N., SMITH, D. C., MCDERMOTT, D. F., POWDERLY, J. D., CARVAJAL, R. D., SOSMAN, J. A., ATKINS, M. B., LEMING, P. D., SPIGEL, D. R., ANTONIA, S. J., HORN, L., DRAKE, C. G., PARDOLL, D. M., CHEN, L., SHARFMAN, W. H., ANDERS, R. A., TAUBE, J. M., MCMILLER, T. L., XU, H., KORMAN, A. J., JURE-KUNKEL, M., AGRAWAL, S., MCDONALD, D., KOLLIA, G. D., GUPTA, A., WIGGINTON, J. M. & SZNOL, M. 2012b. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*, 366, 2443-54.
- TOPALIAN, S. L., WEINER, G. J. & PARDOLL, D. M. 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *J Clin Oncol*, 29, 4828-36.
- TRIEBEL, F., JITSUKAWA, S., BAIXERAS, E., ROMAN-ROMAN, S., GENEVEE, C., VIEGAS-PEQUIGNOT, E. & HERCEND, T. 1990. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med*, 171, 1393-405.
- VAN DER BRUGGEN, P., TRAVERSARI, C., CHOMEZ, P., LURQUIN, C., DE PLAEN, E., VAN DEN EYNDE, B., KNUTH, A. & BOON, T. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254, 1643-7.

- VAN DER BRUGGEN, P., ZHANG, Y., CHAUX, P., STROOBANT, V., PANICHELLI, C., SCHULTZ, E. S., CHAPIRO, J., VAN DEN EYNDE, B. J., BRASSEUR, F. & BOON, T. 2002. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol Rev*, 188, 51-64.
- VEENSTRA, R., KOSTINE, M., CLETON-JANSEN, A. M., DE MIRANDA, N. F. & BOVEE, J. V. 2018. Immune checkpoint inhibitors in sarcomas: in quest of predictive biomarkers. *Lab Invest*, 98, 41-50.
- VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 10, 789-99.
- VOSS, K., LARSEN, S. E. & SNOW, A. L. 2017. Metabolic reprogramming and apoptosis sensitivity: Defining the contours of a T cell response. *Cancer Lett*, 408, 190-196.
- WANG, C., LIU, X., LI, Z., CHAI, Y., JIANG, Y., WANG, Q., JI, Y., ZHU, Z., WAN, Y., YUAN, Z., CHANG, Z. & ZHANG, M. 2015. CD8(+)NKT-like cells regulate the immune response by killing antigen-bearing DCs. *Sci Rep*, 5, 14124.
- WANG, L., ZHANG, Q., CHEN, W., SHAN, B., DING, Y., ZHANG, G., CAO, N., LIU, L. & ZHANG, Y. 2013. B7-H3 is overexpressed in patients suffering osteosarcoma and associated with tumor aggressiveness and metastasis. *PLoS One*, 8, e70689.
- WEINERT, B. T., KRISHNADATH, K. K., MILANO, F., PEDERSEN, A. W., CLAESSEON, M. H. & ZOCCA, M. B. 2009. Real-time PCR analysis of genes encoding tumor antigens in esophageal tumors and a cancer vaccine. *Cancer Immun*, 9, 9.
- WEST, E. J., SCOTT, K. J., JENNINGS, V. A. & MELCHER, A. A. 2011. Immune activation by combination human lymphokine-activated killer and dendritic cell therapy. *Br J Cancer*, 105, 787-95.
- WHERRY, E. J. & KURACHI, M. 2015. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*, 15, 486-99.
- WHITE, M. K., PAGANO, J. S. & KHALILI, K. 2014. Viruses and human cancers: a long road of discovery of molecular paradigms. *Clin Microbiol Rev*, 27, 463-81.
- WIEDER, T., BRAUMULLER, H., KNEILLING, M., PICHLER, B. & ROCKEN, M. 2008. T cell-mediated help against tumors. *Cell Cycle*, 7, 2974-7.
- WITZE, E. S., LITMAN, E. S., ARGAST, G. M., MOON, R. T. & AHN, N. G. 2008. Wnt5a control of cell polarity and directional movement by polarized redistribution of adhesion receptors. *Science*, 320, 365-9.
- WOLCHOK, J. D., KLUGER, H., CALLAHAN, M. K., POSTOW, M. A., RIZVI, N. A., LESOKHIN, A. M., SEGAL, N. H., ARIYAN, C. E., GORDON, R. A., REED, K., BURKE, M. M., CALDWELL, A., KRONENBERG, S. A., AGUNWAMBA, B. U., ZHANG, X., LOWY, I., INZUNZA, H. D., FEELY, W., HORAK, C. E., HONG, Q., KORMAN, A. J., WIGGINTON, J. M., GUPTA, A. & SZNOL, M. 2013. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*, 369, 122-33.
- WOLDEN, S. L. & ALEKTIAR, K. M. 2010. Sarcomas across the age spectrum. *Semin Radiat Oncol*, 20, 45-51.

- WOLF, D. & ROTTER, V. 1985. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 790-4.
- WOMER, R. B., WEST, D. C., KRAILO, M. D., DICKMAN, P. S., PAWEL, B. R., GRIER, H. E., MARCUS, K., SAILER, S., HEALEY, J. H., DORMANS, J. P. & WEISS, A. R. 2012. Randomized controlled trial of interval-compressed chemotherapy for the treatment of localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*, 30, 4148-54.
- WOO, S. R., TURNIS, M. E., GOLDBERG, M. V., BANKOTI, J., SELBY, M., NIRSCHL, C. J., BETTINI, M. L., GRAVANO, D. M., VOGEL, P., LIU, C. L., TANGSOMBATVISIT, S., GROSSO, J. F., NETTO, G., SMELTZER, M. P., CHAUX, A., UTZ, P. J., WORKMAN, C. J., PARDOLL, D. M., KORMAN, A. J., DRAKE, C. G. & VIGNALI, D. A. 2012. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res*, 72, 917-27.
- YANG, Z. Z., GROTE, D. M., ZIESMER, S. C., NIKI, T., HIRASHIMA, M., NOVAK, A. J., WITZIG, T. E. & ANSELL, S. M. 2012. IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest*, 122, 1271-82.
- ZENDMAN, A. J., RUITER, D. J. & VAN MUIJEN, G. N. 2003. Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function. *J Cell Physiol*, 194, 272-88.
- ZHANG, G., HOU, J., SHI, J., YU, G., LU, B. & ZHANG, X. 2008. Soluble CD276 (B7-H3) is released from monocytes, dendritic cells and activated T cells and is detectable in normal human serum. *Immunology*, 123, 538-46.
- ZHANG, J., MEDEIROS, L. J. & YOUNG, K. H. 2018. Cancer Immunotherapy in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Front Oncol*, 8, 351.
- ZHU, C., ANDERSON, A. C., SCHUBART, A., XIONG, H., IMITOLA, J., KHOURY, S. J., ZHENG, X. X., STROM, T. B. & KUCHROO, V. K. 2005. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol*, 6, 1245-52.
- ZHU, J., YAMANE, H. & PAUL, W. E. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol*, 28, 445-89.
- ZHU, X., ASA, S. L. & EZZAT, S. 2008. Fibroblast growth factor 2 and estrogen control the balance of histone 3 modifications targeting MAGE-A3 in pituitary neoplasia. *Clin Cancer Res*, 14, 1984-96.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die experimentelle Dissertation wurde in der Kinderklinik Tübingen (Abteilung I Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie) unter der Betreuung von Prof. Dr. Rupert Handgretinger durchgeführt.

Sämtliche Versuche wurden, nach Einarbeitung durch Sylvia Klein, von mir eigenständig durchgeführt. Eine Ausnahme bildeten teilweise die Versuche zu PRAME (2) und fast vollständig die Versuche zu PRAME (3), welche von Elvira Criado-Moronati durchgeführt wurden. Zusätzlich wurde ich von Stefan Grote in die PCR-Durchführung eingearbeitet. PCRs wurden von Caroline Baden und mir durchgeführt. Außerdem halfen mir Sylvia Klein, Elvira Criado-Moronati, Robin Kleinert und Barbara Goecke teilweise bei der Durchführung von Versuchen. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig.

Die Konzeption der Poster erfolgte durch mich, in enger Absprache mit meinen Betreuerinnen Frau Dr. Simone Kayser und Frau Dr. Sabine Schleicher.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 14.01.2020

Lisa Ruisinger

7 Veröffentlichung

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden als Poster bei der Reisenburg 2016 und beim Forschungskolloquium der Eberhard Karls Universität Tübingen 2017 veröffentlicht. Der Abstract zum Poster des Forschungskolloquiums wurde im Informationsheft veröffentlicht.

8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rupert Handgretinger für die Möglichkeit bei ihm meine Dissertation durchführen zu können und seine Korrektur meiner Arbeit.

Außerdem danke ich meinen Betreuerinnen Frau Dr. Simone Kayser, Frau Dr. Sabine Schleicher und Frau Dr. Marina Schmidt für ihre Anregungen, konstruktive Kritik und Unterstützung. Besonders möchte ich Sylvia für die hervorragende Einarbeitung, Freundlichkeit, Positivität, sowie ihre Hilfe in allen Lebenslagen danken. Ohne sie wäre es mir nicht möglich gewesen die ganzen Versuche durchzuführen. Außerdem danke ich Elvira für ihre Hilfe, mentale Unterstützung und dafür, dass ich teilweise ihre Daten verwenden darf. Des Weiteren danke ich Caroline und Barbara für ihre Hilfe bei manchen Experimenten.

Bedanken möchte ich mich bei meiner Schwester, Denise, für das Korrekturlesen, wie bei meiner ganzen Familie für ihren Erfahrungsschatz und die mentale Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium ermöglicht haben und vor allem dafür, dass ich mir ihrer Unterstützung immer gewiss sein kann.

Meinem Mann, Tobi, danke ich für die moralische Unterstützung, seine Geduld und seine Fähigkeit mich abzulenken.