

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III,
Klinik der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. Michael von Bergwelt

Expansion und Charakterisierung von AML- spezifischen T-Zellen als Testinstrument für ein gegen DZ gerichtetes Antikörperkonstrukt in vivo

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Alina Lohner
aus Korneuburg

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatlerin: Prof. Dr. med. Marion Subklewe

Mitberichterstatler: Prof. Dr. Sebastian Kobold
Prof. Dr. Christoph Salat

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.05.2023

Für meine Familie



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Lohner, Alina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Expansion und Charakterisierung von AML-spezifischen T-Zellen als Testinstrument für ein gegen DZ
gerichtetes Antikörperkonstrukt in vivo

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkennt-
nisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht
und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form
bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Hamburg, 13.05.2023

Ort, Datum

Alina Lohner

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Inhaltsverzeichnis

I Tabellenverzeichnis	I
II Abbildungsverzeichnis	II
IV Abkürzungsverzeichnis	III
1 Summary	1
2 Zusammenfassung	3
3 Einleitung	5
3.1 Akute myeloische Leukämie	5
3.1.1 Epidemiologie	5
3.1.2 Symptome/Klinik	5
3.1.3 Pathogenese	5
3.1.4 Klassifikation	6
3.1.5 Diagnostik	10
3.1.6 Therapiemöglichkeiten.....	10
3.1.7 Immuntherapien in der AML.....	10
3.2 Klassifikation der Zielantigene	11
3.2.1 Leukämie-assoziierte Antigene.....	11
3.2.2 Zelloberflächenantigene.....	12
3.2.3 Neoantigene.....	12
3.3 Wilms Tumor 1	14
3.3.1 Allgemeines zu WT1	14
3.3.2 Rolle von Wilms Tumor 1 in AML	14
3.4 Nucleophosmin.....	15
3.4.1 Allgemeines zu NPM1.....	15
3.4.2 Nucleophosmin 1 in akuter myeloischer Leukämie	15
3.5 Dendritische Zellvakzinierung bei AML	16
3.5.1 Rolle der dendritischen Zelle im Immunsystem	16
3.5.2 Reifung dendritischer Zellen	17
3.5.3 Impfung mit dendritischen Zellen.....	18

3.5.4	Impfung mit ex vivo generierten DZ.....	18
3.5.5	In vivo DZ-Vakzinierung.....	19
4	Arbeitshypothese	21
5	Material und Methoden.....	22
5.1	Material.....	22
5.1.1	Geräte	22
5.1.2	Verbrauchsmaterialien	23
5.1.3	Blutproben.....	23
5.1.4	Kommerzielle Antikörper.....	23
5.1.5	Reagenzien für Zellkultur-Medien und Kryokonservierung von Zellen.....	25
5.1.6	Verwendete Zytokine	25
5.1.7	Puffer und Medien.....	26
5.1.8	Ausgewählte Epitopsequenzen.....	27
5.1.9	Programme	27
5.2	Zellkulturmethoden	27
5.2.1	Zelllinien	27
5.2.2	Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC).....	30
5.2.3	Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten	30
5.2.4	Peptidbeladung von DZs.....	30
5.2.5	Dendritische Zellfärbung	31
5.2.6	Generierung und Expansion von WT1- und NPM1-spezifischen T-Zellen	31
5.2.7	Isolation von CD8+ spezifischen T-Zellen mittels IFN- γ Catch Reagent	32
5.3	Funktionelle Tests.....	33
5.3.1	Allogene DZ-T-Zell-Kokulturen	33
5.3.2	Zytotoxizitätstest	33
5.3.3	Kokultur mit AML Zelllinien	34
5.4	Datenanalyse und Statistik	34
5.4.1	Methoden der Datenanalyse.....	34
5.4.2	Auswertung von Durchflusszytometriedaten	34
6	Resultate	36

6.1	Charakterisierung von dendritischen Zellen	36
6.2	Generierung und Validierung von antigen-spezifischen T-Zellen	36
6.3	Alternativer Ansatz zur Isolation von antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen.....	38
6.4	Zytotoxizitätsversuch mit T2 Zellen.....	40
6.5	Kokultur mit AML-Zelllinien	41
6.6	Kokultur mit CD34+ Knochenmarkszellen.....	43
6.7	Antikörper-vermittelte Peptid-spezifische T-Zell-Aktivierung in allogenen DC/T Zellkokulturen	44
7	Diskussion	48
7.1	Isolation und Expansion von Peptid-spezifischen T-Zellen.....	48
7.2	Wahl des geeigneten Antigens für AML Impfung	49
7.3	Zielzellen von Impfungen	50
7.4	Klinischer Erfolg von Vakzinierungsstrategien	51
7.5	Vergleich von <i>ex vivo</i> mit <i>in vivo</i> DZ Impfung.....	52
7.6	Chancen, Limitationen und Zukunftsperspektiven.....	53
8	Referenzen	56
9	Danksagung	71

I Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	WHO Klassifikation myeloischer Neoplasien 2016.....	7
Tabelle 2	2017 ELN-Risiko Klassifikation durch genetische Verfahren.....	8
Tabelle 3	FAB-Klassifikation	9
Tabelle 4	Liste der technischen Ausrüstung	22
Tabelle 5	Liste der Verbrauchsmaterialien.....	23
Tabelle 6	Antikörper für Durchflusszytometrie	23
Tabelle 7	Standardpuffer- sowie Medien für Zellkulturmethoden sowie Kryokonservierung.....	25
Tabelle 8	Liste der verwendeten Zytokine.....	25
Tabelle 9	Liste der Standard Puffer und Medien für die Zellkultur	26
Tabelle 10	Liste der Programme.....	27
Tabelle 11	Verwendete Zelllinien	28
Tabelle 12	Färbeprotokoll zur Feststellung des Maturierungsstatus bei DZs.....	31

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Gating Strategie am Beispiel vom CMV _{NLV} -positiven T Zellen	35
Abbildung 2	DZ Maturierung	36
Abbildung 3	Isolation WT1 _{VLD} -spezifische Zellen.....	37
Abbildung 4	Isolation NPM1 _{AIQ} -spezifischen Zellen.....	38
Abbildung 5	IFN- γ Sekretionsassay	39
Abbildung 6	WT1 _{VLD} -spezifische T Zellen lysieren Peptid-gepulste T2 Zellen.....	40
Abbildung 7	NPM1 _{CLA} -spezifische T Zellen lysieren Peptid-gepulste T2 Zellen ..	41
Abbildung 8	WT1 _{VLD} spezifische Zellen lysieren AML Zellen.....	42
Abbildung 9	Lyse in AML-Zelllinien.....	43
Abbildung 10	Kokultur mit CD34+ Knochenmarkszellen	44
Abbildung 11	AK-vermittelte Peptid-spezifische T-Zell-Aktivierung	45
Abbildung 12	Allogene Kokultur mit WT1 _{VLD} -spezifischen Zellen	46

IV Abkürzungsverzeichnis

Akronym	Definition
α	Anti-
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ADC	Antibody Drug Conjugate
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CBA	Zytometrischer Bead Array
CD	Cluster of Differentiation
CR	Komplette Remission
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT3a	DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase
DZ	Dendritische Zelle
DPBS	Dulbecco´s phosphate buffered saline
E: T Ratio	Effektor: Target Cell Ratio
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELN	European Leukemia Net
FAB	French-American-British
FACS	Flourescence-activated Cell-Sorting
FDA	Food and Drug Administration
FKS	Fetales Kälberserum
FLT3-ITD	Fms-like Rezeptor-Tyrosinkinase 3, interne Tandemduplikation
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor
GMP	Good Manufacturing Practice
Gy	Gray
HD	Healthy donor

HS	Humanserum
HLA	Humane Leukozytenantigene
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MAC	Multifunktionales Antikörper Konstrukt
moDZ	Monozytenabstammende dendritische Zellen
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MRD	Minimal Residual Disease
MFI	Medianer Fluoreszenzindex
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mDZ	Reife/Maturierte DZ
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
NPM1	Nucleophosmin 1
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat-buffered saline
PD-L1	Programmed cell death protein 1
PRR	Pattern recognition receptor
scFv	Single chain variable fragment
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TSA	Tumor-spezifisches Antigen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrosefaktor
WT1	Wilms Tumor Gen 1

1 Summary

Acute myeloid leukemia is a disease of the hematopoietic system with pathological proliferation of myeloid progenitor cells in the bone marrow. Standard therapy for this disease involves intensive chemotherapy. However, after chemotherapy the majority of patients suffer a relapse. A subsequent allogeneic stem cell transplantation is still considered the only curative approach to disease elimination in the treatment of AML. However, only few patients are eligible for this therapeutic regimen, among others, due to their age or poor overall fitness. It is therefore of great interest to explore new alternatives in therapy. Immunotherapies are a novel promising approach, whereby the patient's own immune system is stimulated to fight the tumor. Immunotherapies comprises various approaches, including vaccination with dendritic cells. These cells have a crucial function in induction of an antitumor response, by presenting tumor antigens to the immune system and thus activating tumor-specific T-cells.

It has already been confirmed in clinical trials that vaccination using dendritic cells can induce antitumor responses. However, the clinical benefit of monotherapy has been limited so far.

Moreover, a number of tumor-associated antigens have been identified that may be relevant targets in AML, including neoepitopes, which arise from tumor-specific mutations and are therefore foreign to the immune system. However, administration of such antigens as a monotherapy has not yet shown satisfying immune responses.

The aim of this work was to combine tumor-associated antigens, especially neoantigens with dendritic cell vaccination, leading to improved clinical efficacy achieved by combining the two monotherapies.

Therefore, tumor-specific T-cells targeting key AML mutations were generated and functionally evaluated. The cells served additionally as a tool to test a α CD40 antibody construct. This antibody consists of a CD40 single-chain variable fragment and a CMV pp65-specific antigen containing epitopes of NPM1 or WT1, leading to activation and antigen-presentation by DCs. Antigen-presentation and DC activation by the antibody should be detected with the tumor-specific T cells.

Two different epitopes were selected as target antigens for vaccination and their efficacy was compared.

On the one hand, Wilms tumor 1 (WT1) was evaluated as a target antigen, which is widely overexpressed in AML and has been evaluated in multiple studies. In this work, a WT1-specific T-cell clone was successfully generated and expanded. Several experiments with this T-cell clone demonstrated improved tumor antigen-specific lysis of various target cells.

On the other hand, the mutant neopeptide Nucleophosmin 1 (NPM1) was evaluated as a second target antigen. This gene was selected based on frequency in AML as well as by high stability in the mutation status in NPM1. The NPM1 specific T-cell clone also showed a targeted immune response against NPM1 mutant AML cell lines.

Additionally, a significantly stronger immune response was observed when evaluating the α CD40-DC antibody construct with the NPM1-specific T-cell clone compared to the generated WT1-specific T-cell clone. As a result, our work indicates that a combination of neoantigens and dendritic cell vaccination is a promising approach.

2 Zusammenfassung

Die akute myeloische Leukämie ist eine Erkrankung des blutbildenden Systems mit pathologischer Vermehrung von myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Die Standardtherapie der Erkrankung umfasst eine intensive Chemotherapie. Im Anschluss an die Chemotherapie erleidet allerdings die Mehrheit der Patienten ein Rezidiv. Eine anschließende allogene Stammzelltransplantation gilt bis heute daher in der Therapie der AML als einzig kurativer Ansatz zur Krankheitselimination. Allerdings kommen nur wenige Patienten für dieses Therapieschemata in Betracht, unter anderem auf Grund ihres Alters oder ihres schlechten Allgemeinzustandes. Es ist daher von großem Interesse, neue Alternativen in der Therapie zu erforschen. Einen neuartigen vielversprechenden Ansatz bieten Immuntherapien, wobei das körpereigene Immunsystem dazu angeregt wird, den Tumor zu bekämpfen. Die Immuntherapien umfassen diverse Ansätze. Einer davon ist die Impfung mit dendritischen Zellen. Diese Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Induzierung einer Antitumor-Antwort, durch die Präsentation von Tumorantigenen an das Immunsystem, wodurch Tumor-spezifische T-Zellen aktiviert werden.

Es wurde bereits in klinischen Studien bestätigt, dass eine Vakzinierung mit dendritischen Zellen Antitumor-Antworten induzieren kann. Der klinische Nutzen einer Monotherapie ist bisher allerdings begrenzt.

Zudem konnten in den letzten Jahren bereits eine Reihe von Antigenen, die in der AML als Zielstrukturen relevant sein können, identifiziert werden, darunter auch Neoantigene, welche aus tumorspezifischen Mutationen entstehen und dem Körper daher fremd sind. Eine Monotherapie durch Verabreichung solcher Antigene zeigte jedoch noch keine zufriedenstellenden Immunantworten.

Ziel dieser Arbeit war es, tumorassoziierte Antigene, insbesondere Neoantigene mit der dendritischen Zellvakzinierung zu verbinden, wodurch eine verbesserte klinische Wirksamkeit durch die Kombination der beiden Monotherapien erreicht werden sollte.

Dazu wurden tumorspezifische T-Zellen generiert, welche gegen wichtige AML Mutationen gerichtet sind, um anschließend ihre Funktion zu testen. Die generierten T-Zellen sollten zudem dazu dienen, ein α CD40 Antikörperkonstrukt zu testen. Der CD40-Antikörper besteht aus einem CD40 single-chain variable fragment, sowie einem CMV pp65-spezifischen Antigen, welches das NPM1/WT1-Epitop enthält, was zur Aktivierung und Antigenpräsentation von DZ führt. Mithilfe der Antigen-

spezifischen T-Zellen sollte die DZ-Aktivierung, sowie die Peptidpräsentation durch den Antikörper nachgewiesen werden.

Als Zielantigen der Impfung wurden zwei verschiedene Epitope ausgewählt und deren Wirksamkeit verglichen.

Einerseits wurde Wilms Tumor 1 ausgewählt, welches in der AML überexprimiert ist und bereits in mehreren Studien evaluiert wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erfolgreich ein WT1-spezifischer T-Zell-Klon generiert und expandiert. In verschiedenen Versuchen mit diesem T-Zell-Klon konnte eine verbesserte Tumorantigen-spezifische Lyse von verschiedenen Zielzellen gezeigt werden.

Als zweites Zielantigen wurde das mutierte Neoantigen NPM1 getestet. Dieses Gen wurde anhand der Häufigkeit in der AML sowie durch eine hohe Mutationsstabilität evaluiert. Die NPM1 spezifischen T-Zellen zeigten ebenfalls eine zielgerichtete Immunantwort gegenüber NPM1 mutierten AML Zelllinien.

Mit dem NPM1 T-Zell-Klon zeigte sich zudem eine deutlich stärkere Immunantwort bei der Evaluierung des α CD40 DZ-Antikörperkonstrukts im Vergleich zum generierten WT1-spezifischen T-Zell-Klon. Damit gibt unsere Arbeit einen Hinweis darauf, dass eine Kombination aus Neoantigenen und dendritischer Zellvakzinierung einen vielversprechenden Ansatz darstellt.

3 Einleitung

3.1 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) bezeichnet eine pathologische Proliferation der myeloischen Zellreihe. Es kommt zur Ausschwemmung von unreifen und funktionsunfähigen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark.

3.1.1 Epidemiologie

Von allen malignen Erkrankungen des hämatologischen Systems entfallen rund 13 % auf akute Leukämien. Die akuten Leukämien umfassen die myeloische sowie die lymphatische Zellreihe, wobei in 80 % der Fälle myeloische Zellen betroffen sind. Während Kinder meist an einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) erkranken, betrifft die AML häufiger Erwachsene, wobei das Erkrankungsrisiko mit dem Alter ansteigt. Bei der Erstvorstellung einer AML sind die Patienten im Durchschnitt 70 Jahre alt. Das Verhältnis von Männern: Frauen beträgt 3:2. Das 5-Jahres-Überleben bei akuter myeloischer Leukämie hat sich in den letzten Jahren durch neue Therapiekonzepte deutlich verbessert, allerdings beträgt dieses immer noch nur 24 % (Stand 2014 in Deutschland) (1-4).

3.1.2 Symptome/Klinik

Bei Erkrankten sind die Symptome meist unspezifisch und vielfältig. Durch Verdrängung gesunder Zellen durch die myeloischen Vorläuferzellen resultieren eine Anämie, Thrombozytopenie und Leukopenie. Die Anämie führt in Folge zu einer Abgeschlagenheit, Dyspnoe und Müdigkeit. Durch die Thrombozytopenie kommt es zu erhöhter Blutungsneigung mit Petechien. Die niedrige Leukozytenzahl bedingt häufig Fieber sowie eine generell erhöhte Infektanfälligkeit. Eine Infiltration unterschiedlichster Organe durch Leukozyten resultiert oft in einer Hepatomegalie, Splenomegalie, Lymphadenopathie oder auch in Knochenschmerzen. Bei einem sogenannten „Leukostasesyndrom“ kommt es zur Bildung von Thromben mit Zirkulationsstörungen. Falls eine akute myeloische Leukämie unbehandelt bleibt, versterben die Patienten oft innerhalb von wenigen Monaten an diesen Komplikationen (5-7).

3.1.3 Pathogenese

Bisher konnten einige Risikofaktoren als Ursprung für die Krankheitsentstehung der AML identifiziert werden. In Einzelfällen kommen frühere Chemotherapien oder

chemische Noxen als Ursache in Betracht. Bei der Mehrheit der Patienten liegt jedoch eine genetische Veränderung durch Chromosomenanomalien oder isolierte Genmutationen vor (8). Bei Kindern und jungen Erwachsenen sind sogar 30-50 % Genmutationen wie Translokationen und Inversionen die Ursache der Krankheitsentstehung (9). Die häufigsten Genmutationen sind Translokationen wie t(8;21), t(15;17) oder inv(16), aber auch eine Trisomie 21 zeigt eine hohe Korrelation mit dem Auftreten der Erkrankung (5).

Neben genetischen Mutationen bestehen bei AML-Patienten außerdem relevante zytogenetische Veränderungen, wodurch in Folge wichtige Prozesse der Zellentwicklung, Proliferation und das Überleben der Zelle deutlich verändert sind. Eine geeignete Therapie ohne beträchtliche Schäden zu entwickeln fällt daher schwer (10).

Ältere Patienten weisen, neben einem schlechteren Allgemeinzustand, häufig in deutlich größerem Umfang zytogenetische Veränderungen auf als jüngere Patienten. Dies führt als Resultat auch oft zu einem schlechteren Ansprechen auf Chemotherapien (11).

3.1.4 Klassifikation

Die akute myeloische Leukämie wird klassifiziert nach der historischen French-American-British-Klassifikation (FAB-Klassifikation) (6, 12) und der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (13). In der FAB-Klassifikation wird die Erkrankung anhand ihrer Morphologie sowie der Zytogenetik eingeteilt. Die FAB-Klassifikation unterscheidet acht verschiedene Untergruppen M0 bis M7 (14). Eine detailliertere Unterteilung erlaubt die WHO Klassifikation (13). Im Jahr 2008 wurden die ersten Genmutationen (NPM1 und CEBPA) als Entitäten in die Klassifikation der WHO für AML aufgenommen (13). Im Jahr 2016 wurde die WHO Klassifikation erneut aktualisiert und umfassten ab diesem Zeitpunkt die Morphologie, Immunphänotypisierung sowie die klinische Präsentation der Erkrankung (15). Zusätzlich werden AML-Patienten abhängig von ihrer Prognose in Untergruppen unterteilt. Das European LeukemiaNet unterteilt die Erkrankung in günstig, intermediäre sowie ungünstige genetische Veränderungen (16). Die Einteilungen sind von Bedeutung, da nach diesen eine Therapieentscheidung für ärztliches Personal empfohlen wird. Neuere Sequenzierungsanalysen ermöglichen mittlerweile eine schnelle Einteilung in die jeweiligen Untergruppen und erleichtern so die Therapieentscheidungen (17).

Tabelle 1 WHO Klassifikation myeloischer Neoplasien 2016
(Döhner H, et al. Diagnosis and Management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel)

AML mit verwandten Neoplasien

AML mit wiederkehrenden genetischen Abnormalitäten
 AML mit t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1
 AML mit inv(16)(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
 Akute Promyelozytenleukämie mit PML-RARA
 AML mit t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
 AML mit t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
 AML mit inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM(EV11)
 AML (Megakaryoblasten) mit t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1
 Provisorische Entität: AML mit BCR-ABL1
 AML mit NPM1 Mutation
 AML mit CEBPA Mutation (biallelisch)
 Provisorische Entität: AML mit RUNX1 Mutation
 AML mit Myelodysplasie-bedingten Veränderungen
 Therapiebedingte myeloische Neoplasie
 AML mit minimaler Differenzierung
 AML ohne Maturierung

AML und verwandte Neoplasien

Akute myelomonozytäre Leukämie
 Akute monoblastische/monozytäre Leukämie
 Rein erythroide Leukämie
 Akute megakaryoblastische Leukämie
 Akute basophile Leukämie
 Akute Panmyelose mit Myelofibrose
 Myeloisches Sarkom
 Myeloische Proliferation im Zusammenhang mit dem Down Syndrom
 Vorübergehende abnormale Myelopoese
 Myeloische Leukämie assoziiert mit Down Syndrom
 Blastische plasmazytoide dendritische Zellneoplasie

Akute Leukämie mit unklarer Abstammung

Akute undifferenzierte Leukämie
 MPAL mit t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
 MPAL mit t(v;11q23.3); KMT2A rearranged
 MPAL, B/myeloisch, NOS
 MPAL, T/myeloisch, NOS

Tabelle 2 2017 ELN-Risiko Klassifikation durch genetische Verfahren
 Döhner H, et al., 2017, Diagnosis and management of acute myeloid leukemia
 in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel)
 Risiko Kategorie Genetische Abnormalität

Günstige genetische Veränderungen

t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1;
 inv(16)(p13,1q22) oder
 t(16;16)(p13.1;q22); CFBF-MYH1 1
 NPM1 Mutation ohne FLT3-ITD oder FLT3-
 ITD
 Biallele CEBPA Mutation

Intermediäre genetische Veränderungen

NPM1 Mutation und FLT3-ITD
 Wildtyp NPM1 ohne FLT3-ITD oder mit
 FLT3-ITD
 (ohne ungünstige genetische Veränderung)
 t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
 Zytogenetische Abnormalität nicht
 klassifiziert
 als günstig oder ungünstig

Ungünstige genetische Veränderung

t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
 t(v;11q23.3); KMT2A rearranged
 t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL 1
 inv(3)(q21.3q26.2) oder t(3;3)(q21.3;q26.2);
 GATA2, MECOM(EVI 1)
 -5 oder del(5q); -7; -17/abn(17p)
 Komplexer Karyotyp, Monosomaler
 Karyotyp
 Wildtyp NPM1 und FLT3-ITD
 RUNX1 Mutation
 ASXL1 Mutation
 TP53 Mutation

Tabelle 3 FAB-Klassifikation

M0

Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung: unreife Blasten ohne Granulation, POX <3 %, EST negativ

M1

Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung: weniger als 10 % reife Zellen (=Promyelozyte, Granulozyten, Monozyten), nur spärliche Granulation, POX >3 %, EST <20 %

M2

Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung: >10 % reife Zellen in der Myelopoese, weniger als 20 % Monozyten, POX >3 % (meist deutlich positiv), EST meist schwach positiv)

M2_{baso}

Akute Basophilen Leukämie

M3

Akute Promyelozytenleukämie: 30 % Promyelozyten (Blastenanteil oft weniger), POX >3 % (meist stark positiv), EST schwach bis mäßig positiv

M3v

Akute Promyelozytenleukämie, mikrogranuläre Form

M4

Akute myelomonozytäre Leukämie: Myeloische Zellen (Blasten und Promyelozyten) >20 %, monozytäre Zellen (Monoblasten und reife Formen) 20 % bis 80 %, POX >3 %, EST >20 % negativ bis leicht positiv, EST >20 % (kräftig positiv)

M5

Akute Monoblasten/Monozytenleukämie: mehr als 80 % der myeloischen Zellen sind Monoblasten bzw. Monozyten, POX meist

M5a

Akute Monoblastenleukämie: mehr als 80 % der myeloischen Zellen sind Monoblasten bzw. Monozyten, davon mehr als 80 % Monoblasten oder Promonozyten, POX meist negativ bis leicht positiv, EST >20 % (kräftig positiv)

M5b

Akute Monozytenleukämie: mehr als 80 % der myeloischen Zellen sind Monoblasten bzw. Monozyten, davon sind mehr als 20 % Monozyten, POX meist negativ bis leicht positiv, EST >20 % (kräftig positiv)

M6

Akute Erythrämie: >50 % aller Zellen sind Erythroblasten oder >30 % aller Blasten unter den nicht-erythrozytären Zellen sind Erythroblasten, häufig trilineäre Dysplasie, POX >3 %, EST kann positiv sein

M7

Akute Megakaryoblastenleukämie: Hochgradig pleomorphe Blasten, POX <3 %, EST kann positiv sein

3.1.5 Diagnostik

Als diagnostische Verfahren werden die Morphologie von Knochenmark und Blutaussstrich, die Analyse von Zelloberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie, die Identifizierung von Chromosomenveränderungen sowie zytogenetische Tests herangezogen (16, 18). Zur Diagnosestellung einer AML müssen im Knochenmark oder Blutaussstrich 20% oder mehr Blasten vorkommen, außer bei t(8;21), t(15;17), t(16;16) sowie inv(16) (7, 16). Die Zytogenetik sollte in ihrer Beurteilung ein Screening auf die häufigsten Mutationen miteinschließen, was sich mittlerweile als Standard etabliert hat. Darunter fallen Mutationen in den Genen NPM1, CEBPA, RUNX, FLT3, TP53 und ASXL1. Im Vergleich zu anderen häufig vorkommenden Tumoren weist die AML relativ wenige, aber oft krankheitsspezifische Mutationen auf (16, 19).

3.1.6 Therapiemöglichkeiten

Die klassische Therapie der akuten myeloischen Leukämie wird in drei Phasen unterteilt: Induktionsphase, Konsolidierungsphase und Erhaltungsphase. Die Induktionsphase soll zu einer kompletten Remission führen. Sie besteht in der Regel aus einer Chemotherapie nach dem „7+3“ Schema. Dabei werden 7 Tage Cytarabin (Pyrimidinanaloga) und im Anschluss 3 Tage Daunorubicin (Antrazyklin) in relativ hohen Dosen verabreicht (5, 7, 16, 20). Als Postremissionstherapie wird entweder eine weitere Chemotherapie oder eine Stammzelltransplantation durchgeführt (16, 21). Die angewandte Chemotherapie ist jedoch bei einem Großteil der Patienten über 60 Jahre nicht mehr kurativ (22).

Der Ansatz mit der besten Wirksamkeit in der Postremissionsphase der AML besteht in einer allogenen Stammzelltransplantation (23). Dennoch kommen nur wenige Patienten für diese Therapie infrage (20). Ausschlusskriterien sind unter anderem ein zu hohes Alter, zahlreiche Komorbiditäten, keine verfügbaren Spender, ein frühes Rezidiv oder auch initial kein Therapieansprechen (24-26). Es besteht daher ein hoher Bedarf an der Entwicklung neuartiger oder alternativer Therapieansätze zur Stammzelltransplantation.

3.1.7 Immuntherapien in der AML

Zur Behandlung einer AML werden seit Neuerem auch immuntherapeutische Ansätze in Betracht gezogen. Die Immuntherapie hat die Krebstherapie in den letzten Jahren revolutioniert (27). Dabei wird über verschiedenste Mechanismen versucht, das eigene Immunsystem anzuregen, um den Tumor zu bekämpfen. Das Konzept der

Immuntherapie ist jedoch bei Leukämien und kalten Tumoren mit geringer Mutationslast deutlich schwieriger anzuwenden (28). Während für die akute lymphatische Leukämie schon viele klinische Studien im Rahmen der Immuntherapie laufen und erste Ansätze bereits zugelassen sind (zum Beispiel Blinatumomab (29, 30) oder CD19-spezifische CAR-T-Zellen (31)), ist dieser Therapieansatz bei AML deutlich schwieriger. Dies ist bedingt durch ein umfassendes Expressionsmuster, welches gleichzeitig auch in der gesunden Hämatopoese zu finden ist (27). Im letzten Jahrzehnt jedoch haben sich auch im Bereich der AML viele neue Therapiekonzepte entwickelt. Aktuell umfasst die Immuntherapie im Bereich der AML fünf verschiedene Konzepte: Antikörper-Wirkstoff Konjugate (ADC), T-Zell rekrutierende Antikörperkonstrukte, chimäre Antigenrezeptor T-Zellen (CAR T-Cells), Checkpoint-Inhibitoren sowie die dendritische Zellvakzinierung (27). Für die Impfung mit dendritischen Zellen müssen AML relevante Zielstrukturen gewählt werden. In der Regel werden Tumorantigene als Zielstruktur gewählt. Im folgenden Kapitel werden unterschiedliche zur Wahl stehende Kandidaten für eine dendritische Zellvakzinierung genauer besprochen.

3.2 Klassifikation der Zielantigene

Die Wahl des Antigens für die Impfung ist entscheidend und hat große Auswirkungen auf den Impferfolg. Zu den wichtigsten Kriterien, die Antigene erfüllen sollten, zählen unter anderem die therapeutische Funktion, die Immunreaktion, die Spezifität und auch die Häufigkeit eines solchen Antigens im Patienten (32).

3.2.1 Leukämie-assoziierte Antigene

Um einen Tumor besser zu kontrollieren und eine Antitumorreaktion hervorzurufen, spielt die Erkennung von tumorassoziierten Antigenen mithilfe von humanen Leukozytenantigenen (HLA) eine entscheidende Rolle (33).

In diesem Zusammenhang sind Leukämie-assoziierte Antigene (LAA) relevant. Es konnten bereits viele LAAs identifiziert werden, welche eine T-Zell-Antwort in der AML hervorrufen. Zu diesen zählen unter anderem BAGE, BCL-2, G250, PRAME, RHAMM, Proteinase 3 und WT1 (34). LAAs übernehmen zwei wichtige Rollen: Sie erhöhen die Zellproliferation und führen zu spezifischen T-Zell-Antworten. Eine Therapie mit Leukämie-assoziierten Antigenen ist auch nach Hochdosischemotherapie einsetzbar. Es wäre zwar aufgrund einer Zytopenie als Nebenwirkung eine geringere T-Zell-

Aktivität zu erwarten, diese sind aber in ihrer Funktion nicht eingeschränkt und zeigen sogar erhöhte Proliferationsraten nach Stimulation (35, 36).

Nachdem diese Antigene dem eigenen Körper sehr vertraut sind, muss der Impfstoff die Toleranzschwelle für das Antigen brechen und die wenigen Antigen-reaktiven CD8+ T-Zellen rekrutieren, um eine Immunantwort zu erhalten (37). Damit die T-Zell-Antwort nicht unterdrückt wird beziehungsweise weiterhin bestehen bleibt, gibt es die Möglichkeit zur Verwendung von Adjuvantien (38). Durch diese kann eine Verstärkung der Impfung stattfinden, damit eine längere Wirksamkeit sichergestellt werden kann.

3.2.2 Zelloberflächenantigene

Verschiedene charakteristische Zelloberflächenantigene werden von myeloischen Zellen exprimiert. Zu den am häufigsten in der AML verwendeten Oberflächenmarker zählen CD33 sowie CD123 (39). Diese Antigene werden häufig als Ziel im Rahmen der CAR T-Zelltherapie oder auch für Antikörper-Wirkstoff-Konjugate verwendet (40). Bei diesen Antigenen ist es allerdings möglich, dass damit auch gesunden Zellen als Zielzellen erkannt und eliminiert werden, was eine Anämie der betreffenden Zellen zur Folge hat.

3.2.3 Neoantigene

Neben Leukämie-assoziierten und ursprungsabhängigen Antigenen gibt es auch sogenannte Leukämie-spezifische Antigene. Diese Neoantigene entspringen aus einer nicht-synonymen somatischen Mutation (41). Sie werden erst während der Tumorentstehung gebildet und kommen daher in gesunden Zellen nicht vor (42). Neoantigene in Krebszellen sind somit mutierte Peptide, die durch eine zufällige Mutation vom Immunsystem erkannt werden (43). Insertionen, Deletionen und Einzelnukleotidvarianten, welche zu Frameshifts im Gen führen, zählen zu den Veränderungen die Neoantigene hervorbringen (44). Ein großer Vorteil von Neoantigenen ist, dass sie durch ihre Eigenschaften zu keiner T-Zell-Toleranz führen (45). Somit wird eine On-Target-Off-Tumor Toxizität, wie sie bei Leukämie-assoziierten Antigenen auftreten kann, verhindert. Der Begriff Neoantigen wird teilweise auch für Antigene verwendet, welche komplett tumorspezifisch sind. Zu diesen zählen zum Beispiel Peptide, die durch abberantes RNA-Spleißen gebildet wurden (44). Zu den bekannten Leukämie-spezifischen Antigenen gehören FLT3-ITD, DEK-CAN, AML 1-ETO, PML-RAR α und NPM1 (46, 47).

Durch Genomsequenzierung konnten bereits viele patienteneigene und speziell auf den Tumor zugeschnittene Peptide identifiziert werden, wobei die Identifikation von häufigen Neoantigenen in diesem Fall eine besondere Herausforderung darstellt (33). Es werden verschiedenste Verfahren angewandt, welche teilweise eine große Anzahl an Tumorantigenen erkennen (48-50). Es muss allerdings davon ausgegangen werden, dass von etwa 1000 nicht-synonym gefundenen Mutationen in der Regel nur ein Neoantigen entsteht, welches auf HLA präsentiert wird (51, 52).

3.2.3.1 Impfung mit Neoantigenen

In der Forschung wurde nach diesen Erkenntnissen eine Impfung mit Neoantigenen konzipiert, um spezifische T-Zellen zu rekrutieren.

Eine Verringerung der Tumormasse nach Infusion von Neoantigen-spezifischen-T-Zellen bewies, dass CD8+ positive T-Zellen auf mutierte Antigene reagieren, jedoch ohne relevante Toxizität zu verursachen (45). Ein erfolgreiches Beispiel ist die Infusion von HPV-spezifischen T-Zellen beim Zervixkarzinom (53).

Beim metastasierten Melanom und Glioblastom wurden bereits personalisierte Neoantigenimpfungen durchgeführt. Dabei wurden durch Analysen patienteneigene Mutationen identifiziert und dem Patienten als Impfstoff injiziert. Es konnten positive Antworten durch T-Zell-Antworten sowie teilweise ein Ausbleiben von Rezidiven nach der Impfung beobachtet werden (51, 54, 55).

Bei der Wahl der Neoantigene sollte generell darauf geachtet werden, dass es sich um Mutationen handelt, die in Tumoren stark ausgebildet sind sowie eine hohe Stabilität aufweisen und in einem Großteil der Patienten vorkommen (56). Das am besten erforschte und am häufigsten nachgewiesene Neoantigen in der AML ist die NPM1 Mutation, welches dadurch ein attraktives Ziel für eine Impfung bei AML-Patienten darstellt. In Kapitel 3.4. wird näher auf die NPM1 Mutation eingegangen.

Eine Kombination aus mehreren unterschiedlichen Antigenen scheint sinnvoll zu sein, um das Risiko einer Runterregulation von Zielantigenen auf malignen Zellen zu minimieren. Dieser Effekt wurde häufig bei einer Therapie mit CAR T-Zellen beobachtet (39). Es wäre zum Beispiel möglich, Leukämie-assoziierte Antigene mit Leukämie-spezifischen Antigenen zu kombinieren, um mehrere gleichzeitige Angriffspunkte zu haben (57). In diesem Zusammenhang könnte WT1 als häufiges Leukämie-assoziiertes Antigen eine wichtige Rolle spielen.

3.3 Wilms Tumor 1

3.3.1 Allgemeines zu WT1

Das Wilms Tumor 1 (WT1) Gen befindet sich auf Chromosom 11p13 (58). Es kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit einer Aktivator- und einer Repressordomäne und spielt eine entscheidende Rolle in den Bereichen des Zellwachstums sowie der Zelldifferenzierung (59). WT1 wurde ursprünglich den Tumorsuppressorgenen zugeordnet, basierend auf der Existenz von WT1-Mutationen in verschiedenen Tumorentitäten (60). Dagegen wurde eine Überexpression von WT1 in akuten Leukämien und vielen soliden Tumoren festgestellt (61). Zudem wird das Wachstum von WT1-exprimierenden Leukämiezelllinien durch einen siRNA-induzierten Knockdown von WT1 gehemmt (62). Deshalb wird WT1 heute eher eine onkogene Funktion zugeschrieben (46, 60, 63). Neben vieler weiterer Funktionen ist WT1 auch an der Mitose der Zellen beteiligt, indem es das Checkpoint-Protein MAD2 reguliert und dadurch Einfluss auf die chromosomale Stabilität besitzt (64).

WT1 wird in kleinen Mengen auch in gesunden Zellen exprimiert, wie im zentralen Nervensystem, in den Keimdrüsen und teilweise auch im Rahmen der Hämatopoese (60). Durch das Vorkommen in gesunden Zellen kann es unter WT1 Therapie zu einer On-Target-Off-Tumor Toxizität kommen (39). Dabei findet eine Immunreaktion gegen gesunde Zellen statt.

In Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der WT1 Expression den Leukämiefortschritt verhindern konnte und bei hoher Expression von WT1 eine Induktion der Leukämie stattfand und somit die onkogene Funktion von WT1 zusätzlich unterstreicht (65). Bei kompletter Deletion des WT1 Gens folgten pathologische Veränderungen wie Glomerulosklerose, eine Atrophie des Pankreas, ein Verlust des Knochenvolumens sowie eine Störung der Hämatopoese (66).

3.3.2 Rolle von Wilms Tumor 1 in AML

Die Überexpression von WT1 ist in einem Großteil der AML-Patienten nachweisbar (67) und wird korreliert mit einem reduzierten Langzeitüberleben sowie einem schlechteren Ansprechen auf Chemotherapie (67-70), wobei andere Studien diesen Effekt nicht sicher belegen konnten (71). WT1 Mutationen waren zudem häufig gemeinsam mit Mutationen im FLT3-IDT oder CEBPA Gen nachweisbar (72). Da WT1 ein intrazelluläres Protein ist, werden für immuntherapeutische Ansätze verschiedene WT1-Peptide als Tumortarget untersucht, die vor allem auf HLA*02 präsentiert werden

(73). Insbesondere das Peptid RMFPNAPYL (WT1₁₂₆₋₁₃₄), präsent im wild-typ Protein, als auch das Peptid VLDFAPPGA (WT1₃₇₋₄₅), welches durch eine WT1-Mutation entsteht, zeigten sich als besonders immunogen (74, 75).

Eine Impfung mit Wilms Tumor 1 in Kombination mit weiteren Zusätzen wurde bereits in zahlreichen Studien erprobt (76-81). Der Nachweis einer Immunantwort erfolgte in der Regel anhand der Messung von WT1-spezifischen T-Zellen und verstärkter IFN- γ Sekretion. Die Wirkung der Impfung war allerdings oft nicht von langer Dauer, was häufige Auffrischungsimpfungen erforderlich machte (79).

In mehreren Studien mit Peptid- und DZ-basierten Impfungen mit WT1 als Zielantigen konnte eine gute Verträglichkeit, spezifische Immunreaktionen und verbesserte 5 Jahres-Überlebensraten nachgewiesen werden (59, 82, 83).

3.4 Nucleophosmin

3.4.1 Allgemeines zu NPM1

Nucleophosmin (NPM) wandert als Protein zwischen Zellkern und Zytoplasma. Es verhindert, dass Proteine im Nucleolus aggregieren und transportiert Partikel durch die Kernmembran (84). Außerdem übernimmt es eine wichtige Funktion im Signalweg des p53-Tumorsuppressorgens (85). Nachdem NPM eine relevante Rolle in der Tumorsuppression spielt, könnten Störungen in der Bewegung von NPM zwischen dem Zytosol und dem Zellkern als Anhaltspunkt für die Entstehung einer Tumorerkrankung wichtig sein. Die Nucleophosmin-Gruppe umfasst mehrere Mitglieder (NPM1, NPM2, NPM3 und NPM-ähnliches Protein) und wird zu den Histon-Chaperonen gezählt (86).

3.4.2 Nucleophosmin 1 in akuter myeloischer Leukämie

In einer Studie von Falini et al. konnte bei etwa einem Drittel der AML Patienten zytoplasmatisches NPM1 nachgewiesen werden. Diese Lokalisation ist bedingt durch eine Mutation in Exon 12 im Nucleophosmin Gen (87). Eine Mutation im NPM1 Gen zählt durch ein Vorkommen in fast 30 % der Patienten zu den häufigsten Mutationen bei der akuten myeloischen Leukämie, wobei ein Großteil der Patienten zusätzliche Mutationen in der Methylierung und in der Hydroxymethylierung aufweisen (DNMT3a, IDH1, TET2) (88-91). NPM1 Mutation war mit vielen morphologischen Subtypen der Erkrankung, oft einem normalen Karyotyp und in der Regel auch mit gutem Ansprechen auf Chemotherapie verknüpft (87, 90, 92). In mehr als 90 % der Patienten waren vor allem drei Typen von NPM1 Mutationen (Typ A, B und D) vorhanden (88,

90, 93). Eine NPM1 Mutation tritt in der AML am häufigsten zusammen mit anderen Mutationen auf, meist in Kombination mit einer DNMT3a oder mit FLT3-ITD Mutation (91). Patienten mit einer NPM1 Mutation ohne FLT3-ITD Mutation zeigen ein besseres Gesamtüberleben im Vergleich, wobei die Ursachen hierfür noch nicht ganz aufgeklärt sind (94).

In einer großen Kohortenstudie wurde festgestellt, dass NPM1 Mutationen fast ausschließlich sekundäre Ereignisse waren, die erst nach DNMT3a-, IDH1- oder NRAS-Mutationen auftraten und so auf ein bestimmtes Mutationsmuster hindeuten (89). Mutationen wurden häufiger in Frauen nachgewiesen und traten in Kombination mit DNMT3a Mutation mit höheren Leukozytenzahlen sowie höheren Blastenzahlen im Knochenmark auf (95). Die meisten Patienten mit NPM1 Mutation scheinen nicht von einer Stammzelltransplantation als Erstlinientherapie zu profitieren (90).

Ein hohes Transkriptionslevel an mutiertem NPM1 gilt als negativ prognostischer Faktor mit hohen Rückfallquoten in Patienten mit MRD (Minimal Residual Disease) (96). Eine Therapie, die auf NPM1 abzielt, ist daher auch ein erfolgversprechender Ansatz in der Therapie der Minimalen Resterkrankung.

NPM1 wurde als Target für Immuntherapien bereits häufiger getestet. In einer aktuellen Studie von Xie et al. wurde NPM1 bereits als Target für die Chimäre Antigenrezeptor (CAR) T-Zell-Therapie verwendet. Es konnten erfolgreich CAR T-Zellen generiert werden, die in vitro und in vivo Zytotoxizität von NPM1+/HLA-A2+ Zelllinien und primäre AML Zellen vermittelten, aber nicht von NPM1- bzw. HLA-A2-Zellen. Die Verwendung von mutiertem NPM1 als Ziel hat zudem den Vorteil, dass On-Target-Off-Tumor-Toxizität reduziert werden kann (97).

Darüber hinaus wurden von Van der Lee et al. NPM1 T-Zell-Rezeptoren (TCR) generiert und konnten in Mausversuchen eine gute Wirksamkeit mit Vermehrung von CD8+ spezifischen T-Zellen nachweisen (98).

3.5 Dendritische Zellvakzinierung bei AML

3.5.1 Rolle der dendritischen Zelle im Immunsystem

1973 wurden durch Steinman et al. in peripheren lymphatischen Organen die dendritischen Zellen (DZs) als neuer Zelltyp identifiziert (99), die zu den Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) gezählt werden (100). Dendritische Zellen sind in der Lage, eine 10 bis 100-fach stärkere T-Zell-Proliferation auszulösen als Monozyten oder B-Zellen (101). Sie prozessieren Pathogene, nachdem sie diese in die Zellen

aufgenommen haben und präsentieren die erzeugten Peptid-Fragmente auf Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) Klasse I und II (102, 103). Durch die Antigenpräsentation induzieren DZs sowohl CD4+ und CD8+ T-Zell-Antworten, als auch Natürliche Killerzell-Antworten (104, 105). Dies geschieht unter anderem durch die Ausschüttung von IL-12 und anderen Zytokinen. Sie stellen somit eine Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität dar (106). Dendritische Zellen sind in ihrer Rolle als Abwehrzellen auch in der Lage zur sogenannten „Kreuzpräsentation“. Dabei werden internalisierte Tumorassoziierte Antigene (TAA) auf MHCI präsentiert, die in Folge eine Aktivierung von TAA-spezifischen CD8+ T-Zellen verursachen können (107, 108). Diese besondere Funktion der dendritischen Zelle kann genutzt werden, um tumorspezifische Antworten und in Folge auch ein länger anhaltendes T-Zell-Gedächtnis zu erzielen (108). Damit die „Kreuzpräsentation“ funktioniert, muss das jeweilige Antigen über das Endosom oder Phagosom geleitet werden, wo es entsprechend prozessiert wird (109). Dendritische Zellen sind durch ihre besondere Rolle somit die stärksten Stimulatoren des Immunsystems von inaktiven und naiven T-Zellen (110).

3.5.2 Reifung dendritischer Zellen

Zur Auslösung von Antigen-spezifischen T-Zell-Reaktionen ist die Reifung der DZs von großer Relevanz (100, 111). Erst durch die Reifung kommt es zu einer Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen, zur Expression von Chemokinrezeptoren und zu einer Verstärkung der Antigenpräsentation der DZs (112). Es sind deshalb nur reife DZ in der Lage, eine adäquate T-Zell-Antwort hervorzurufen. Ausgelöst wird eine natürliche Reifung durch mikrobielle Produkte, welche die Aktivierung von Pattern Recognition Receptors (PRR) oder RIG-1 fördern oder durch bestimmte Zytokine (113, 114).

Da DZs nur ungefähr 1 % der mononuklearen Zellen im Blut ausmachen, ist es eine Herausforderung große Mengen an dendritischen Zellen zu produzieren. Daher wurden für in vitro-Versuche und Vakzinierung häufig aus Monozyten generierte DZs verwendet (115). Zur Generierung von DZs aus Monozyten sind viele unterschiedliche Protokolle publiziert und wurden durch die Zugabe von bestimmten Zytokinen (wie IL-6, IL-1) und Prostaglandinen rasch optimiert (116). Die Protokolle zur Maturierung wurden zudem tendenziell zeitlich verkürzt. Neuere Protokolle ermöglichen die Generierung von reifen DZs aus Monozyten innerhalb von 72 Stunden anstelle von 5-7 Tagen (117, 118).

3.5.3 Impfung mit dendritischen Zellen

In der Regel werden zur DZ Vakzinierung Zellen verwendet, welche aus Monozyten hervorgehen, insofern sie die größte Immunantwort hervorrufen sollen und ohne großen Aufwand aus peripheren Blutproben herzustellen sind (27). Es ist allerdings bis heute noch nicht klar, welche DZ-Untergruppe das beste Mittel zur Vakzinierung ist (119).

Dendritische Zellen lassen sich in drei große Untergruppen einteilen: Plasmazytoide DZs (pDZ), myeloide/konventionelle DZ1s (cDZ1) sowie myeloide/konventionelle DZ2s (cDZ2). Jede einzelne Untergruppe reagiert auf unterschiedliche Pathogene und interagiert mit spezifischen T-Zellgruppen (120, 121). cDZ1 zeichnen sich vor allem durch Antigen-Kreuzpräsentation an CD8+ T-Zellen aus und produzieren große Mengen an IL-12, während cDZ2 eher CD4+ T-Helfer-Zell-Reaktionen induzieren (122). Im Gegensatz dazu werden pDZs vor allem nach Virusinfektion aktiv und sondern große Mengen an Typ-I-Interferonen ab (123). Es existieren neben den Hauptuntergruppen zwei weitere DZ Gruppen, welche aus deren Vorläufern hervorgehen. Dazu zählen die Langerhans-Zellen (LCs) sowie die von Monozyten stammenden DZs (moDZs), welche vor allem im Gewebe eine Antigenpräsentation sowie Produktion von Interleukinen leisten (122, 124).

Eine Impfung mit Leukämie-assoziierten Antigenen in Form von Peptid-basierten Impfstoffen konnte noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielen. Dies ist vor allem durch eine T-Zell-Toleranz sowie ineffiziente T-Zell-Antworten zu erklären (125).

Anhand der besonderen Rolle von DZ im Rahmen von Immunreaktionen wurde die These aufgestellt, dass DZ ein geeignetes Mittel für eine Impfung mit Antigenen darstellen würden (119). Um diese These zu bestätigen, wurden gesunde Probanden mit Antigen-gepulsten DZ geimpft. Dabei konnten antigenspezifische Immunantworten beobachtet werden, während eine reine Peptid-basierte Impfung keine Reaktion auslöste (126).

Für die Impfung mithilfe von dendritischen Zellen stehen zwei unterschiedliche Ansätze zur Verfügung, welche in den folgenden beiden Kapiteln vorgestellt werden.

3.5.4 Impfung mit ex vivo generierten DZ

Für die DZ-Vakzinierung werden häufig DZ verwendet, die ex vivo aus Monozyten generiert und mit Tumorantigenen beladen wieder in den Patienten zurücktransferiert

werden. Die DZ sollen anschließend zu den Lymphknoten wandern und dort antigen-spezifische Immunantworten auslösen.

Es konnten allgemein in vielen Tumorentitäten erste Erfolge mittel DZ Vakzinierung gezeigt werden, diese sind allerdings noch verbesserungsfähig. In einer umfangreichen Metaanalyse wurden in 77 % beim Prostatakarzinom sowie in 61 % beim Nierenzellkarzinom antigen-spezifische zelluläre Immunantworten nach DZ Impfung detektiert (127). Als erfolgreiches Beispiel wurden in einer Phase I-Studie TLR7/8 gereifte, mit RNA transfizierte DZ, die unter anderem für CMVpp65, WT1 und PRAME kodieren, AML Patienten verabreicht. Die Verabreichung war problemlos und einfach durchführbar, führte kaum zu Nebenwirkungen und zeigte eine Vermehrung antigenspezifischer CD8+ sowie CD4+ T Zellen im Blut (128, 129). Beim Prostatakarzinom wurde die DZ Vakzinierung mit dem TLR3-Agonisten poly-ICLC verknüpft und resultierte in MHC-I-Tetramer Analysen in einer antigenspezifische T-Zell-Vermehrung sowie teilweise in einem verzögerten Fortschreiten der Erkrankung in der Bildgebung (130).

Des Weiteren wurde Sipuleucel-T als der erste DZ Impfstoff von der FDA (Food and Drug Administration) zugelassen, welcher zur Behandlung vom Prostatakarzinom eingesetzt wird (131). Eine allogene DZ Impfung wurde bereits an mehreren Patienten in der Postremissionsphase getestet und konnte ein verlängertes Langzeitüberleben korrelierend mit der Aufrechterhaltung der T-Zell-Funktion durch die Impfung nachweisen (132).

Bei DZ-Vakzinierungen wurden zudem unterschiedliche Injektionsmethoden, wie intradermal, intranodal oder auch direkte Tumoringjektionen im Hinblick auf die Migration der DZ in die Lymphknoten getestet. Dabei konnte jedoch keine bevorzugte Methode sichergestellt werden (115).

Eine Impfung mit ex vivo generierten DZs hat zwar bereits einige Fortschritte gemacht, allerdings sind die Behandlungsergebnisse noch nicht zufriedenstellend. Außerdem ist diese Methode sehr kosten- sowie arbeitsintensiv und kann auch nicht standardisiert ablaufen, da für jeden Patienten ein individueller Impfstoff produziert werden muss (119).

3.5.5 In vivo DZ-Vakzinierung

Ein alternativer Ansatz verfolgt die Aktivierung der dendritischen Zellen direkt im Körper durch in der Regel spezielle Antikörper (133). Diese sollen über Rezeptoren,

welche von dendritischen Zellen exprimiert werden, in die Zellen eindringen und dann wieder präsentiert werden, um eine Immunreaktion auszulösen (134, 135). Dieser Ansatz hat den Vorteil, dass kein patientenindividueller Impfstoff produziert werden muss, wodurch Kosten gesenkt werden können. Zudem können mit dieser Methode die natürlichen DZs im Körper direkt stimuliert und aktiviert werden (119).

Verschiedene DZ-Antigene werden zurzeit für in vivo DZ-Vakzinierungen getestet, wobei insbesondere CD40 als Zielantigen verwendet wird (136). Der Einsatz von agonistischen CD40-Antikörpern soll eine Aktivierung beziehungsweise Reifung der DZs hervorrufen, welche dann in Folge proinflammatorische Zytokine produzieren und eine T-Zell-Aktivierung induzieren (119). Ein CD40-Antikörper, welcher in Funktion eines Wirkverstärkers verabreicht wird, soll dadurch die Reaktion von CD8+ T-Zellen gegenüber dem spezifischen Antigen erhöhen (137). Neben dem CD40-Antikörper gibt es noch weitere Wirkverstärker, die eine ähnliche Funktion ausüben (134).

In Studien wurden für dieses Verfahren kaum relevante Nebenwirkungen festgestellt und in Kombination mit anderen Immuntherapien, vor allem der Immuncheckpoint Blockade zeigte sich ein verbessertes Überleben (138, 139). Beim Pankreaskarzinom führte die Kombination aus einem α CD40 Antikörper mit Chemotherapie und α PD-1 zu einer Verringerung der Tumormasse und führte zu einem verbesserten Überleben im Mausmodell (138). In einer Phase I Studie mit agonistischem CD40 Antikörper in Kombination mit Gemcitabine zeigte sich bei fortgeschrittenem Adenokarzinom des Pankreas ein verbessertes Gesamtüberleben mit Rückgang der Lebermetastasen (139).

Eine Impfung mit dendritischen Zellen wird in vielen Studien kombiniert mit weiteren Immuntherapien und erzielt dadurch noch deutlich bessere Ergebnisse (140). In einem Mausmodell beim metastasierten Mammakarzinom wurde die DZ-Vakzinierung mit P60 (einem Peptid, welches Foxp3 hemmt) kombiniert und resultierte in einem vermindertem Tumorwachstum sowie einer längeren Überlebenszeit (141). Arab et al. kombinierten DZ Vakzinierung mit einer Blockade des Adenosin Rezeptors A2A sowie CD73 und erreichten damit eine erhöhte IFN- γ Produktion sowie verminderte IL-10 Spiegel (142).

4 Arbeitshypothese

Für die akute myeloische Leukämie existiert vor allem in der Rezidivphase noch keine vielversprechende Therapie sowie eine Alternative für Patienten, bei denen eine allogene Stammzelltransplantation nicht infrage kommt. Deshalb werden zurzeit unter anderem unterschiedlichste immuntherapeutische Konzepte verfolgt, inklusive der dendritischen Zellvakzinierung. Bei dieser werden dem Patienten entweder *ex vivo*-modifizierte DZ verabreicht, oder spezielle Antikörper, die DZ direkt im Körper aktivieren. Dies soll zu einer Tumorantigenpräsentation auf den MHC-Molekülen der DZ führen und T-Zell-Antworten induzieren, die zur Lyse von Tumorzellen führen.

Ziel dieser Arbeit war es, Antigen-spezifische T-Zell-Klone zu generieren, welche gegen entscheidende Mutationen der akuten myeloischen Leukämie gerichtet sind. Diese Tumor-spezifischen T-Zellen sollten dazu dienen, in Folge ein DZ Antikörperkonstrukt zu testen. In diesem Ansatz werden folglich die DZ Vakzinierung mit einer leukämieassoziierten oder leukämiespezifischen Antigentherapie verbunden.

Die erfolgreich generierten spezifischen T-Zell-Klone wurden auf ihre Funktionalität untersucht. Dazu wurden AML Zelllinien sowie primäre AML Zellen herangezogen und die Tumorlyse durch die spezifischen T-Zellen untersucht, wobei die gesunden hämatopoetische Zellen unbeeinflusst bleiben sollten. Im Anschluss wurde in einer Kokultur mit den generierten T-Zellen ein α CD40-DZ- Antikörperkonstrukt getestet. Durch die Versuche sollte eine neue Kombinationstherapie von tumorspezifischen Antigenen und Neoantigenen mit DZ-Vakzinierung näher untersucht werden.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Geräte

Tabelle 4 Liste der technischen Ausrüstung

Bezeichnung	Hersteller
Sterilwerkbank HERA SAFE 2020	Thermo Scientific, Langenselbold, D
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
Zellzählgerät Countess II	Life Technologies, Singapore, SGP
Mirkoskop Leica DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Invertiertes Mikroskop	Zeiss, Jena, D
FACS Aria III	BD Bioscience
Guave easyCyte 6HT	Merck Millipore
Inkubator	Binder, Tuttlingen, D
FACS Cytotflex S/LX	Beckmann Coulter, Krefeld, D
Microplate-Reader Infinite M1000 Pro	Tecan Group, Männedorf, CH
Wasserbad VWB 12	VWR, Leuven, B
Kühlschrank 2-8°C	Liebherr, Bulle, CH
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bulle, CH
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific
Mini Vortex Mixer SU1900	Neolab, D
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Scientific, Waltham, USA
Bestahlungsgerät XStrahl RS225	XStrahl, Ratingen, D
PipettBoy Acu Integra	Bioscience, Fernwald, D
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg, D

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5 Liste der Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 1,5/ 2 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen 15/ 50 ml	Corning, Reynosa, Mexico
Polystyrene-round-bottom-tube 5 ml	Corning, Reynosa, Mexico
Pipettenspitzen 0,5-20/ 2-200/ 50-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, D
Serologische Pipetten 5/ 10/ 25 ml	Corning, Durham, USA
Zellkulturplatten 6/ 12/24/48/96 well	Corning, Durham, USA
Nunc Zellkulturplatten 6/12 well	Nuncleon Delta Surface, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt, D
Zellkulturschale 35/ 100 mm	Eppendorf, Hamburg, D
Zellkulturflaschen T25/T75/T175	Corning, Durham, USA
Leucosep Röhrchen	Greiner Bio-One
Countess™ cell counting chamber slides	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Cryogenic Vials 1,8 ml	Starlab, Hamburg, D

5.1.3 Blutproben

Peripheres Blut wurde von gesunden Spendern gesammelt und gemäß der Deklaration von Helsinki sowie mit Genehmigung der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München verwendet. Die primären AML Zellen stammen von Patienten des LMU Klinikums Großhadern.

5.1.4 Kommerzielle Antikörper

Tabelle 6 Antikörper für Durchflusszytometrie

Antigen	Flourophor	Reaktivität	Isotyp	Hersteller	Klon
CD2	APC, FITC	human	Mouse IgG1	BioLegend	RPA2.10

CD3	APC, FITC	human	Mouse IgG2	BioLegend	17A2
CD8	FITC, PerCPeFlour710, BV	human	Mouse IgG1	BioLegend	SK1
NPM1 _{LAV} - spezifischer TCR (Quick switch Tetramer)	PE	human		MBL	
IFN- γ	PE	human	Mouse IgG1	BioLegend	B27
TNF- α	APC	human	Mouse IgG1	BioLegend	MAb11
CCR7	APC	human	REAffinity	Miltenyi	REA108
CD45RA	Bv421	human	Mouse IgG2	BioLegend	HI100
CD80	BV510, APC	human	Mouse IgG1	BioLegend	2D10
CD83	PerCP-Cy5.5	human	Mouse IgG1	BioLegend	HB15e
CD86	APC	human	Mouse IgG1	BioLegend	BU63
CD19	FITC, PE	human	Mouse IgG1	BioLegend	HIB19
CD33	PE, BV421	human	Mouse IgG1	BioLegend	WM53
CD34	PC-7	human	Mouse IgG2	BioLegend	561
CD38	AF750	human	Mouse IgG1	BioLegend	HB-7

CD69	FITC-C	human	Mouse IgG1	Biolegend	FN50
Zombie Green Fixable Viability Kit				Invitrogen	
Live/Dead Fixable Aqua dead				Invitrogen	

5.1.5 Reagenzien für Zellkultur-Medien und Kryokonservierung von Zellen

Tabelle 7 Standardpuffer- sowie Medien für Zellkulturmethoden sowie Kryokonservierung

Bezeichnung	Hersteller
RPMI 1640 Medium	PAN Biotech, Aidenbach, D
DPBS	PAN Biotech, Aidenbach, D
VLE RPMI 1640 (very low endotoxin)	PAN Biotech, Aidenbach, D
X-VIVO 15 Medium	Lonza, Verviers, B
DMSO	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, D
Ficoll	Biochrome, Berlin, D
EDTA	Invitrogen, Bleiswijk, NL
FKS/FBS	Invitrogen, Bleiswijk, NL
Trypanblau	Invitrogen, Bleiswijk, NL

5.1.6 Verwendete Zytokine

Tabelle 8 Liste der verwendeten Zytokine

Zytokin	Hersteller
GM-CSF (Granulozyten-stimulierender Faktor)	Peptotech, Hamburg, D
IL-4	Peptotech, Hamburg, D

IL-7	Peptotech, Hamburg, D
IL-15	Peptotech, Hamburg, D
PGE-2 (Prostaglandin 2)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
IL-1 β	R&D Systems, Minneapolis, USA
TNF- α	Peptotech, Hamburg, D
IFN- γ	Peptotech, Hamburg, D
R848	Invivogen, Toulouse, F
PHA-L	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
IL-2	Peptotech, Hamburg, D
IL-21	Peptotech, Hamburg, D

5.1.7 Puffer und Medien

Tabelle 9 Liste der Standard Puffer und Medien für die Zellkultur

Bezeichnung	Bestandteile
FACS-Puffer	DPBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA
Fixationspuffer für FACS	FACS-Puffer 2 % Formaldehyd
R10-Kulturmedium für Zelllinien	RPMI 1640 1 % Hapes 1 % Pen/Strep/L-Glutamin 10 % FKS (hitze-aktiviert)
Kryomedium für Kryokonservierung	FKS+ 10 % DMSO

5.1.8 Ausgewählte Epitopsequenzen

1. Sequenz 288-296 von mutiertem NPM1 Protein (mNPM1_{CLA})
RMTDQEAIQDL**CLAVEEVSLRK** (Transduzierte TCR- Zellen aus dem Labor von Van der Lee et al. (98))
2. Sequenz 283-291 von mutiertem NPM1 Protein (mNPM1_{AIQ})
RMTDQE**AIQDLCLAVEEVSLRK** (von unserer Arbeitsgruppe generierter Klon)

Die Sequenz 283-291 wurde von uns anlehnend an das Paper von Greiner et al. (143) ausgewählt. Die Vorteile bestehen darin, dass es die häufigste Mutation im NPM1 Protein ist und Greiner et al. zeigen konnten, dass eine Zunahme von peptid-spezifischen Zellen nach Impfung mit spezifischen CD8+ T-Zellen sichtbar war (143). Es waren hoch-afide Bindungspotentiale sowie ausreichend T-Zell-Antworten zu sehen.

3. Sequenz 37-45 von mutiertem WT1 Protein (WT1_{VLD}) **VLDFAPPGA**

Diese Sequenz wurde nach dem Abstract von Smithgall et al. *Identification of a novel WT1 HLA-A*0201-restricted CTL epitope using whole gene in vitro priming.* auf der Jahrestagung der American Society of Hematology 2001 ausgewählt. Ein weiterer Nachweis zur Funktionalität dieses Klons wurde durch eine vergleichende Studie von Rezvani et al gezeigt (73).

5.1.9 Programme

Tabelle 10 Liste der Programme

Programm	Hersteller
FlowJo v9	TreeStar, Ashland, OR, USA
GraphPad Prism version 6 und 8.2	GraphPad Software Inc.

5.2 Zellkulturmethoden

5.2.1 Zelllinien

Die Zelllinien HL-60, OCI-AML 3, BV-173, MOLM 13 sowie SKM-1 wurden entsprechend den Angaben der DSMZ bei 37°C unter 5 % CO₂ sowie 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert und regelmäßig auf Kontaminationen mit Mykoplasmen getestet.

Tabelle 11 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Hersteller	Zytogenetik	Molekulargenetik	Positive Immunfluoreszenz
HL-60	DSMZ ACC 3	AML FAB M2; PB; 35 Jahre, W	Humaner hyperdiploider Karyotyp XX, -X, -X, -8, -8, -16, -17, -17, +18, +22, +2 mar, ins(1;8) (p?31;q24hsr) x2, der (5) t(5;17) (q11;q11)x2, add (6)(q27)x2, der(9) del(9)(p13)t(9;14) (q?22;q?22) x2, der(14)t(9;14) (q?22;q?22)x2, der(16)t(16;17) (q22;q22)x1-2, add (18)(q21)	MYC Gen; c-myc Amplicons	CD4+ CD13+ CD15+ CD33+
OCI-AML3	DSMZ ACC 582	AML FAB M4; PB; 57 Jahre, M	Humaner Hyperdiploider Karyotyp 48(45-50)<2n>X/XY,+1,+5,+8,der(1)t(1;18)(p11;q11),i(5p),del(13)(q13q21),dup(17)(q21q25)	NPM1, DNMT3a, R882C	CD4+ CD13+ CD15+ CD34+ CD68+
MOLM-13	DSMZ ACC 554	AML FAB M5a (RAEB); PB; 20 Jahre, M	Humaner hyperdiploider Karyotyp 51(48-52)<2n>XY,+8,+8,+8,+13,del(8)(p1?p2?),ins(11;9)(q23;p22p23)	FLT3 ITD; CBL deltaExon8 mutant	CD4+ CD15+ CD33+ cyCD68+

SKM-1	DSMZ ACC 547	AML FAB M5 (RAEB-T); PB; 76Jahre, M	Humaner hyperdiploider Karyotyp 43(38-43), <2n>XY,+1,-12,-14,-20,-21, t(1;19)(q21;q13),del(2)(p11), del(9)(q12),add(17)(p1?),der(10)t(10;?21)(p11;q11),-21	N-ras, K-ras	CD4+ CD13+ CD15+ CD33+ HLA-DR+
BV-173	DSMZ ACC 20	CML; 45 Jahre, M	Humaner hyperdiploider Karyotyp 47(46-48)<2n>X/XY, -9,+22,+mar, add(1)(q42), add(8)(p23), t(9;22)(q34;q11), der(22)t(9;22)(q34;q11),der(?)t(9;?)(?p11;?)	BCR-ABL e13-a2	CD10+ CD13+ CD19+ HLA-DR+

5.2.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC)

Mit Heparin versetztes peripheres Blut wurde 1:1 mit PBS verdünnt. 15 ml einer Ficoll-Trennlösung wurden in einen 50 ml Falcon vorgelegt, mit 30 ml des verdünnten Blutes langsam überschichtet und zentrifugiert (30 min, 820 rcf mit langsamem Anfahren und Abbremsen der Zentrifuge). Die Leukozyten-haltige Schicht (engl. *buffy coat*) wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und zweimal mit DPBS gewaschen. Die Zellen wurden entweder direkt weiterverwendet oder in R10-Medium resuspendiert, oder in Kryomedium bei -150 °C für eine spätere Verwendung gelagert. Zum Einfrieren wurden Mr. Frosty Behälter verwendet.

5.2.3 Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten

Dendritische Zellen wurden anlehnend an das Protokoll von Lichtenegger et al. aus PBMCs oder reinen Monozyten generiert (144). Reine Monozyten wurden aus PBMCs mit Monocyte Isolation Kit II, human (Miltenyi Biotech) gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. PBMCs oder Monozyten von gesunden Spendern wurden in DZ-Medium (Endotoxinarmes RPMI 1640 versetzt mit 1,5 % Humanserum (Pool von Blutgruppe AB-positiven männlichen Erwachsenen, Institut für Transfusionsmedizin, Suhl) und einer Konzentration von $0,5 \times 10^7$ Zellen/ml resuspendiert und in 6- oder 12-Well-Platten (Nuncleon Delta Surface, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark) kultiviert, welche eine Oberflächenbehandlung für verbesserte Zelladhärenz besitzen. Nach zwei Stunden wurden die nicht-adhärenenten Zellen abgenommen und bei 37 °C weiter kultiviert. Die adhärenenten Zellen wurden zweimal mit Medium gewaschen und anschließend für 48 Stunden bei 37 °C in DZ-Medium versetzt mit 800 IU/ml GM-CSF (Peprotech), 580 IU/ml IL-4 (Peprotech) und 250 ng/ml PGE2 (Sigma-Aldrich) kultiviert, um in Folge unreife DZs zu erhalten. Zur vollständigen Reifung der DZs wurden anschließend 2000 IU/ml IL-1 β (R&D Systems), 1100 IU/ml TNF- α (Peprotech), 5000 IU/ml INF γ (Peprotech) und 1 μ g/ml R848 (Invivogen) hinzugefügt. Um sicherzustellen, dass die dendritischen Zellen gereift sind, wurde die Expression von Reifungsmarkern (CD80, CD83, CD86 und HLA-DR) überprüft und die Zytokinsekretion mittels Durchflusszytometrie quantifiziert und mit den unreifen DZs verglichen.

5.2.4 Peptidbeladung von DZs

Zur Peptidbeladung von DZs wurden verschiedene Verfahren verwendet. Einerseits wurden unreife und reife DZs mit WT1- oder NPM1-Peptiden für 1,5-2 Stunden bei 37

°C in serumfreiem Medium beladen. Andererseits wurden unreife DZs für 24 Stunden mit α -CD40 Antikörperkonstrukt inkubiert, an die eine NPM1- oder WT1-Antigendomäne fusioniert wurde. Für NPM1 wurden unterschiedliche Reinheitsgrade zugegeben, um einen Unterschied in der Wirksamkeit festzustellen. (NPM1_{VAV}, JPT, Berlin, Germany sowie NPM1_{LAV}, JPT, Berlin, Germany)

5.2.5 Dendritische Zellfärbung

Dendritische Zellen wurden in ihrer vollständigen Maturierung getestet. Die Zellen wurden mit verschiedenen Oberflächenmarkern (siehe Tabelle 1), welche eine relevante Rolle im Rahmen der DZ-Maturierung spielen, gefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Tabelle 12 Färbeprotokoll zur Feststellung des Maturierungsstatus bei DZs

Flourophor	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	APC	Bv421/ PacBlue	KO525
Isotyp	IgG1 ebioscience	IgG1 ebioscience	CD3	IgG1 ebioscience	IgG2b Biolegend	Live/Dead
DC 1	CD14 ebioscience	CD80 BD	CD3	CD83 BD	HLA-DR Biolegend	Live/Dead
DC 2	CD274 (PD-L1) BD	CD40 Biolegend	CD3		CD86 Biolegend	Live/Dead

5.2.6 Generierung und Expansion von WT1- und NPM1-spezifischen T-Zellen

PBMCs wurden von HLA-A*02:01-positiven Spendern isoliert, reife DZs erzeugt und für zwei Stunden mit Peptid gepulst. Die DZs wurden anschließend mit 30 Gy bestrahlt. Aus den nicht-adhärennten Zellen wurden autologe CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe des CD8⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec) gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Zusätzlich wurde eine CD45R0 und CD57 Depletion eingesetzt, um Gedächtnis T-Zellen auszuschließen und in Folge nur naive T-Zellen für die weiteren Versuche zu erhalten. Anschließend wurde eine Kokultur aus gepulsten DZs und isolierten CD8⁺ T-Zellen in einem Verhältnis von 4:1 T-Zellen: Dendritische Zellen angesetzt, in RPMI 1640-Medium mit 5 % HS und 30 ng/ml IL-21 (Peprotech). Nach drei und sechs Tagen

wurde die Kokultur 1:1 mit RPMI 1640-Medium mit 10 ng/ml IL-15 (Peprotech) und 10 ng/ml IL-7 (Peprotech) expandiert. Nach neun Tagen wurden die WT1- oder NPM1-positiven T-Zellen mittels Tetramer gefärbt und mit einem FACS Aria III (BD Bioscience) gesortet. Das benutzte Tetramer wurde zuvor an das jeweilige Peptid zusammen mit einem Peptide Exchange Factor gebunden. Um die gesorteten T-Zellen anschließend zu expandieren, wurden PBMCs von zwei HLA*02:01-positiven Spendern (1:1 gemischt) als Feederzellen verwendet und mit 1 μ M WT1- oder NPM1-Peptid in X-VIVO-15-Medium (Lonza) für 2 h bei 37 °C gepulst. Die Feederzellen wurden mit 30 Gy bestrahlt und in einer Konzentration von $0,4 \times 10^6$ Zellen/ml in X-VIVO 15-Medium mit 5 % HS, 10 ng/ml IL-7, IL-15 und 0,5 μ g/ml PHA-L (Sigma-Aldrich) resuspendiert. Die Expansion erfolgte in einer 6-Well-Platte für Suspensionszellen (Sarstedt). Nach drei Tagen wurde die Hälfte des Volumens durch frisches X-VIVO 15-Medium mit 5 % HS, 50 U/ml IL-2 (Peprotech), 20 ng/ml IL-7 und 20 ng/ml IL-15 ersetzt. Im Anschluss wurden die Zellen alle 4-6 Tage mit gleichem Medium expandiert, wenn sich das Medium gelb verfärbte. Experimente mit diesen T-Zellen konnten 9-20 Tage nach der Expansion durchgeführt werden. Eine Fütterung der Zellen mit den Zytokinen war nach vollendeter Expansion nur noch alle 14-20 Tage notwendig. Die expandierten T-Zellen wurden auch eingefroren und für neue Experimente frisch aufgetaut.

5.2.7 Isolation von CD8+ spezifischen T-Zellen mittels IFN- γ Catch Reagent

Ein IFN- γ Catch Reagent (Miltenyi Biotec) wurde angewendet, um die Ausbeute positiver NPM1_{A1Q} spezifischer CD8+ T-Zellen zu erhöhen. Dazu wurden CD3+ Zellen mit dem EasySep™ Human CD3 positive Selection Kit II (Stemcell) isoliert und in einer 96-Well Platte für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ mit Peptid gepulst. Das im Anschluss verwendete IFN- γ Catch Reagent setzte sich aus zwei unterschiedlichen Antikörpern zusammen. Der erste Antikörper, welcher als Catch Reagent bezeichnet wird, bindet bei 37 °C an die Leukozytenoberfläche, wodurch diese in Folge IFN- γ sezernierten. Ein zweiter IFN- γ Detektionsantikörper, welcher an PE konjugiert ist, bindet entsprechend an IFN- γ sezernierende Zellen. IFN- γ positive Zellen wurden anschließend durch Fluorescence-activated cell sorting (FACS) isoliert. Das Gating erfolgte wie bereits oben beschrieben. Die positiven Zellen wurden in RPMI+ 5 % HS+ 0,1 % P/S mit zugegebenem IL-2 sowie IL-7 weiter in Kultur gehalten. Als Positivkontrolle wurde ein CEFT-Peptidpool verwendet, welcher aus einem Mix von 27 Peptiden spezifisch für CMV, EBV, Tetanus und Influenza besteht und daher häufig

vorkommende Peptide an der Zelloberfläche detektiert. Es wurden zwei verschiedene NPM1-Peptide mit unterschiedlichen Reinheitsgraden verwendet. Das High Purity Peptid wies eine Reinheit von über 95 % auf, während das Low Purity Peptid nur eine Reinheit von über 65 % aufbringen konnte.

5.3 Funktionelle Tests

5.3.1 Allogene DZ-T-Zell-Kokulturen

Für die DZ-T-Zell-Kokultur wurden PBMCs von HLA-A*02:01-positiven Spendern gesammelt und aus den PBMCs anschließend DZs generiert. Dendritische Zellen wurden mit 200nM Peptid-gekoppelten CD40 Antikörper (α CD40. α FITCNPM1-Mutation, α CD40. α FITCWT1), mit α CD40-Antikörpern, die mit einem Kontrollpeptid konjugiert waren, oder mit α Her2-Kontrollen für unspezifische Bindung vor dem Versuch zusammen inkubiert. Da es auch möglich ist, dass die α CD40-vermittelte DZ-Reifung auch unabhängig von konjugierten Peptid-spezifischen T Zellen aktiviert werden kann, wurde der α CD40-Antikörper mit Kontrollpeptid konjugiert und mit den anderen Antikörpern verglichen. Damit sollte die Peptid-Spezifität auf WT1 beziehungsweise NPM1 untersucht werden.

Die dendritischen Zellen wurden nach Peptidbeladung mit den WT1- oder NPM1-spezifischen T-Zellen, die wie oben beschrieben erzeugt sowie vermehrt wurden, in einem Verhältnis von 1:5 DZ : T-Zellen für 4 bis 6 Stunden in DZ-Medium mit zugesetztem 25 μ M Monesin und 10 μ g/ml Brefeldin A bei 37 °C in einer Konzentration von 1uM kultiviert. Die T-Zell-Aktivierung wurde mittels intrazellulärer Färbung von CD8+ T-Zellen analysiert, sowie durch die Messung der Zytokinkonzentration im Zellkulturüberstand mit einem Cytometric Bead Array (CBA; BD Bioscience) gemäß den Anweisungen des Herstellers auf der Grundlage der IFN- γ und TNF- α -Sekretionsmenge. Der CBA wurde auf einem Guava easyCyte 6HT (Merck Millipore) oder auf einem Cytoflex S (Beckmann Coulter) gemessen.

5.3.2 Zytotoxizitätstest

Expandierte WT1- oder NPM1-spezifische T-Zellen oder unspezifische CD8+ T-Zellen von gesunden Spendern, wurden 24 Stunden lang mit T2-Zellen im Verhältnis von 1:4 T-Zellen: T2-Zellen und mit verschiedenen Konzentrationen von WT1-beziehungsweise NPM1-Peptid inkubiert. Alternativ wurden NPM1-spezifische T-Zellen mit den HLA-A* 02:01+ und NPM1-mutierten Zelllinien MOLM-13-, SKM1 und OCI-AML 3 mit oder ohne Zugabe von NPM1-Peptid getestet. Die Zellen wurden

anschließend mit dem LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific) und fluoreszenzmarkierten α CD19 (PE; BioLegend) und α CD2 (APC; BioLegend) Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

5.3.3 Kokultur mit AML Zelllinien

Für die Kokultur wurden HL-60, BV-173, MOLM 13, SKM1, OCI-AML3 sowie primäre AML Zellen verwendet. Die Zelllinien wurden aufgetaut und bis zu den Versuchen in Kultur gehalten. Es wurde eine E:T Ratio von 1:4 gewählt. Die Zelllinien wurden mindestens 24 Stunden zusammen mit den T-Zellen inkubiert. Vor Anlegen der Kokultur wurden die peptid-gepulsten Zelllinien jeweils 1 Stunde mit 1 μ g/ml Peptid gepulst. Die Zellkulturen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert gemessen an einem Cytotflex S beziehungsweise LX (Beckman Coulter).

5.4 Datenanalyse und Statistik

5.4.1 Methoden der Datenanalyse

Für die Datenanalyse wurde Prism v8 (GraphPad, Stadt, USA) verwendet. Unterschiede in der Reifung dendritischer Zellen, der T-Zell-Aktivierung und der Proliferation wurden mit dem Wilcoxon Signed Rank Test bewertet, bei dem abhängige Stichproben mit unbekannter Verteilung miteinander verglichen wurden. Für die Antigenexpression wurden die mediane Fluoreszenzintensität mit folgender Formel als MFI Ratio normalisiert:

$$\text{MFI Ratio} = \text{MFI Oberflächenmarker} / \text{MFI Oberflächenmarker}_{\text{Isotyp}}$$

Ein Schwellenwert von 1,5 wurde als untere Grenze für die Antigenexpression angesehen.

5.4.2 Auswertung von Durchflusszytometriedaten

Durchflusszytometriedaten wurden mit FlowJo v9 (Tree Star, Ashland, OR, USA) ausgewertet. Die Zellen wurden zunächst nach ihrer Zellgröße im Forward-Scatter und nach ihrer Granularität im Side-Scatter gated sowie durch unterschiedliche Fluoreszenz-markierte Antikörper gefärbt. Dies ermöglicht eine Unterscheidung zwischen AML Zellen und T-Zellen. Mittels einer LIVE/DEAD-Färbung wurden die toten Zellen von den Analysen ausgeschlossen. Die gleiche Gating-Strategie wurde auch auf die jeweiligen Isotyp-Kontrollen angewandt, um einen idealen Vergleich darzustellen.

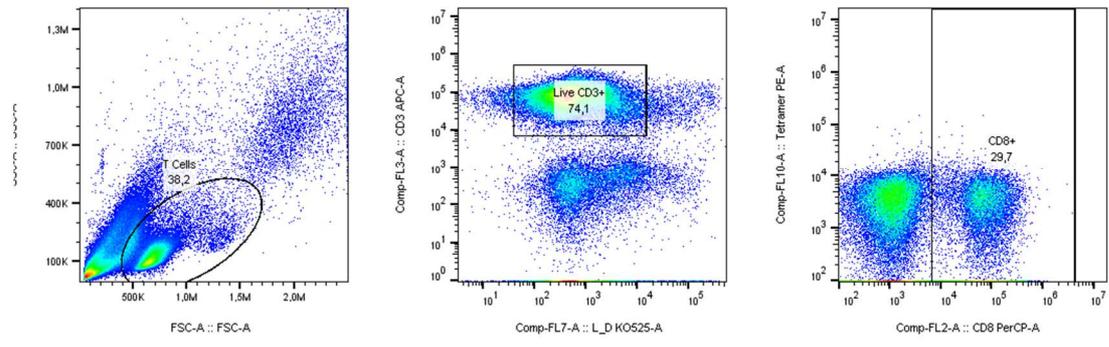


Abbildung 1 Gating Strategie am Beispiel vom CMV_{NLV}-positiven T Zellen

6 Resultate

6.1 Charakterisierung von dendritischen Zellen

Der Maturierungszustand der dendritischen Zellen wurde anhand verschiedener Oberflächenmarker analysiert. Abbildung 2 zeigt ein repräsentatives Beispiel für reife DZs nach Aktivierung mit R848. Die DZs kennzeichneten sich durch eine niedrige Expression von CD14 (MFI-Ratio: 2,3) und hoher Expression von HLA-DR (MFI-Ratio: 204,2) sowie den DZ-Aktivierungsmarkern CD80 (MFI-Ratio: 124,6), CD83 (MFI-Ratio: 10,7), PD-L1 (MFI-Ratio: 33,1), CD86 (MFI-Ratio: 306,8), CD40 (MFI-Ratio: 110,8).

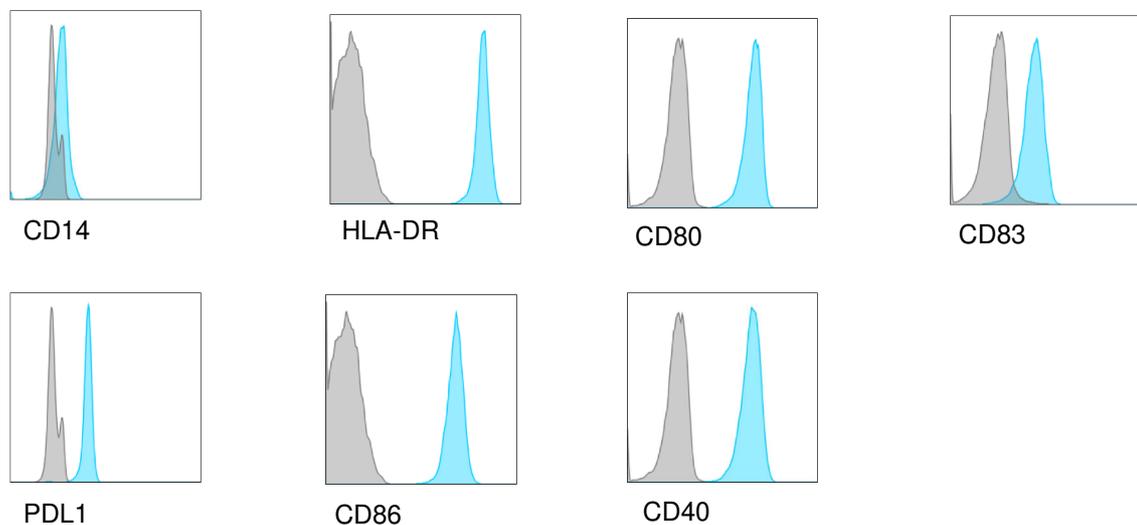


Abbildung 2 DZ Maturierung

Expression von CD14 und verschiedenen DZ-Aktivierungsmarkern an einem repräsentativen Beispiel für DZs nach 2 Tagen. Antigenexpression in blau und jeweilige Isotypkontrolle in grau.

6.2 Generierung und Validierung von antigen-spezifischen T-Zellen

Für die Kokulturrexperimente wurden WT1_{VLD}- und NPM1_{AIQ}-spezifische T-Zellen isoliert und expandiert in Anlehnung an das Protokoll von Wölfl und Greenberg (145).

Nach neun Tagen wurden für das Sortieren von antigen-spezifischen T-Zellen diese mit einem entsprechenden Peptid-konjugierten Tetramer gefärbt. Wie in Abbildung 3

sichtbar, waren 0,7 % der CD8⁺ T-Zellen spezifisch für WT1_{VLD}. Als Positivkontrolle wurden zusätzlich CEFT-spezifische T-Zellen generiert mit einem Anteil von 6,33 %.

Mit demselben Ansatz wurde auch versucht, NPM1-spezifische T-Zellen zu generieren. Allerdings waren nur wenige CD8⁺ T-Zellen antigen-spezifisch (0,017 %), im Vergleich zur Negativkontrolle mit Nicht-Peptid-konjugiertem Tetramer (0,015 %) (Abbildung 4). Für die nachfolgenden Experimente wurde deshalb ein TCR-transgener NPM1_{CLA} Klon von van der Lee et al. (98) hergenommen.

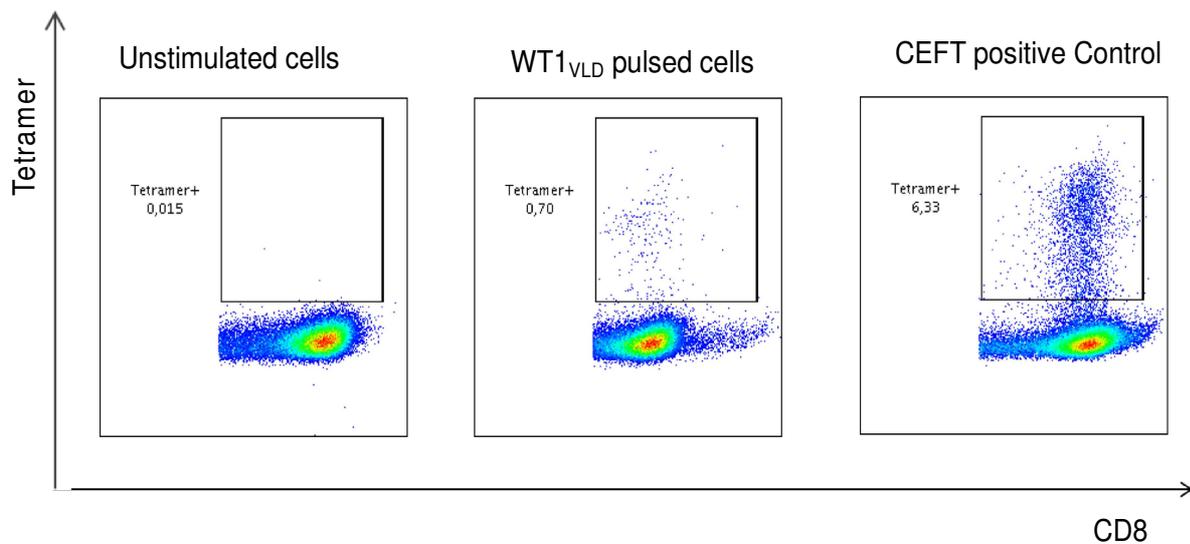


Abbildung 3 Isolation WT1_{VLD}-spezifische Zellen

Sorten von WT1_{VLD}-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Tetramerfärbung (Mitte). Links dargestellt die Negativkontrolle mit unstimulierten Zellen und rechts die Positivkontrolle mit CEFT-spezifischen CD8⁺ T-Zellen.

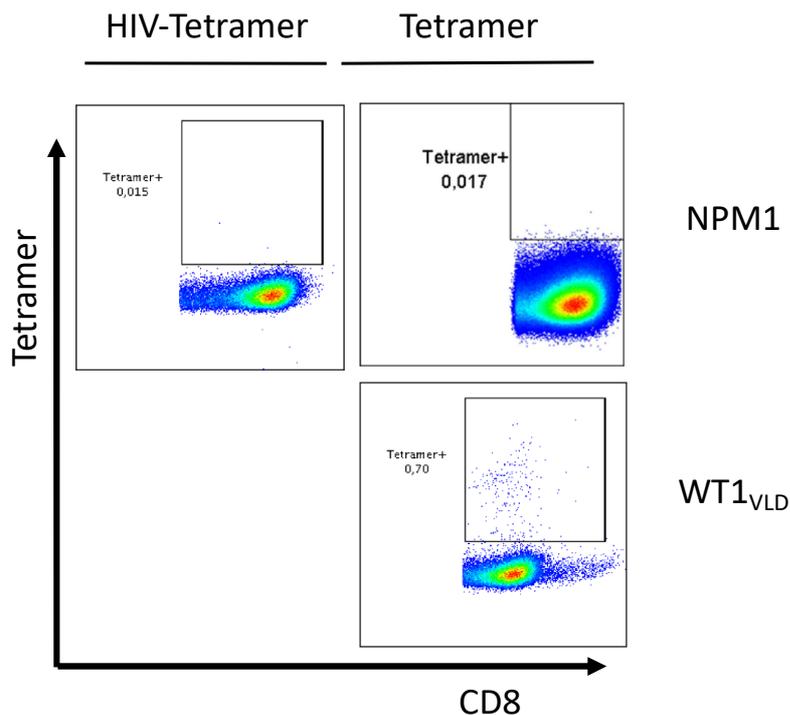


Abbildung 4 Isolation NPM1_{AIQ}-spezifischen Zellen

Sorten von NPM1_{AIQ}-spezifischen CD8⁺T-Zellen (oben), links als Kontrolle eine Färbung mit HIV-Tetramer, als Positivkontrolle die gesorteten WT1_{VLD} spezifischen CD8⁺T-Zellen (unten).

6.3 Alternativer Ansatz zur Isolation von antigen-spezifischen CD8⁺T-Zellen

Nachdem per Tetramerfärbung kaum NPM1-spezifische CD8⁺ T-Zellen isoliert werden konnten, wurde als alternativer Ansatz ein IFN- γ Sekretionsassay verfolgt, bei dem T-Zellen nach Peptidstimulation mit einem speziellen Antikörper zur Ausschüttung von IFN- γ stimuliert werden.

Die Gatingstrategie entsprach der oben bereits genannten, als Positivkontrolle wurde ein CEFT Pool verwendet (55,6 %). Mit dem IFN- γ Catch Versuch wurde mit zwei unterschiedlich stark aufgereinigten NPM1-Peptiden getestet, ob die Reinheit des Peptids einen großen Einfluss auf die detektierte Zellzahl an IFN- γ ⁺ T-Zellen hat. Beim weniger aufgereinigten NPM1-Peptid (Low Purity, 65 % Reinheitsgrad) war die Anzahl an IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen deutlich geringer als bei dem stärker aufgereinigten (High Purity, 95 % Reinheitsgrad) NPM1-Peptid (7,8 % versus 35,5 %).

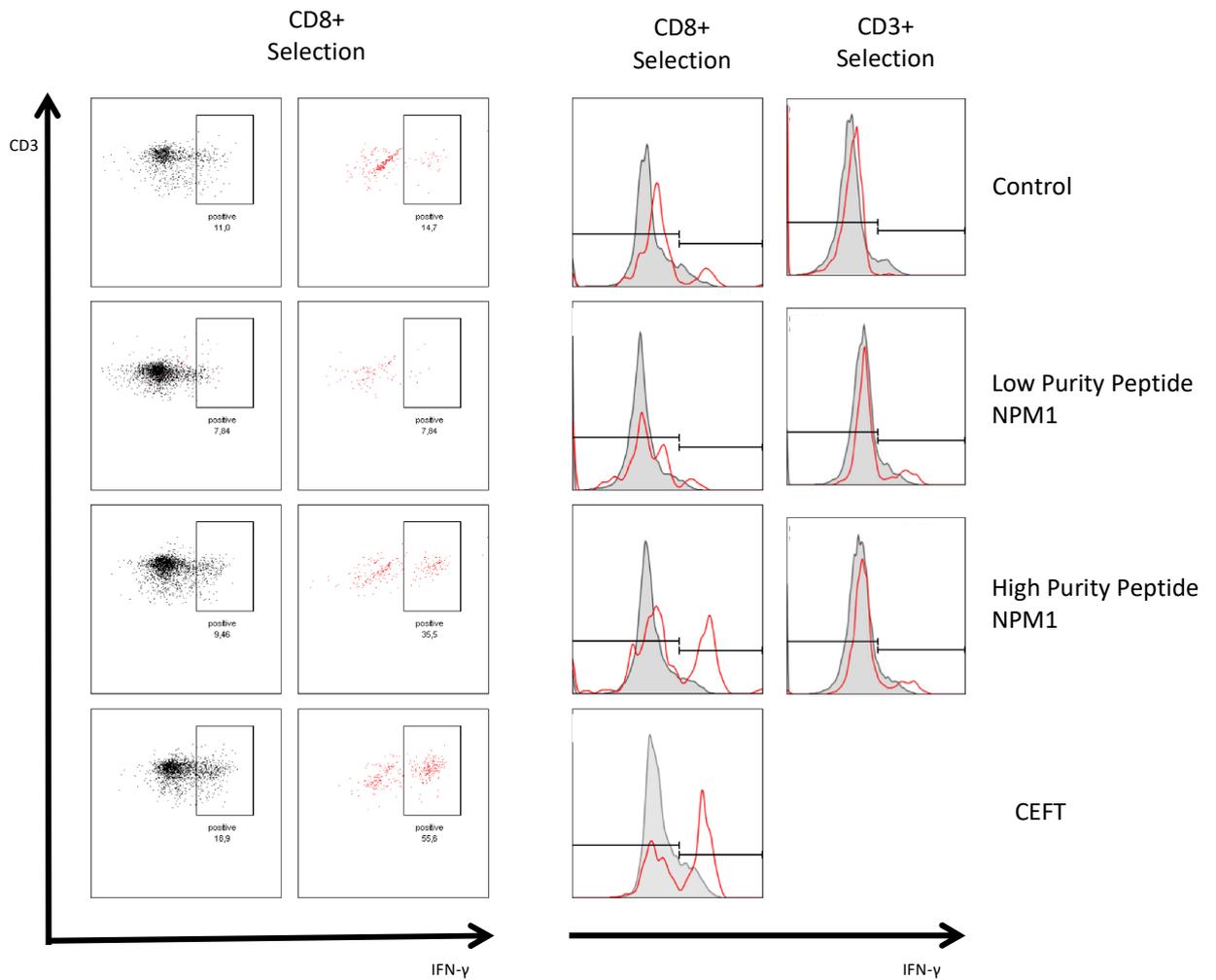


Abbildung 5 IFN- γ Sekretionsassay

IFN- γ Sekretionsassay mit Verwendung von unterschiedlich stark aufgereinigten NPM1-Peptiden. Die Zellen wurden zuvor mittels HumanSep CD3 positive Selection Kit II isoliert und anschließend auf CD3 sowie CD8 positive Zellen gated. Der Isotyp wurde in schwarz/grau dargestellt, die IFN- γ Färbung in Rot.

Im linken Abschnitt der Abbildung wurden die Populationen mittels Dot plots ausgewertet, während im rechten Abschnitt ein Vergleich zwischen CD8+ Selektion und CD3+ Selektion im Histogramm dargestellt wurde. Die Isolation mit High Purity Peptide NPM1 zeigte reichlich NPM1 spezifische CD8+ T-Zellen (35,5 %) während mit Low Purity Peptide NPM1 (7,8 %) nur wenige spezifische T-Zellen sichtbar waren.

6.4 Zytotoxizitätsversuch mit T2 Zellen

Um die Spezifität der expandierten T-Zellen zu überprüfen, wurde eine Kokultur mit T2 Zellen durchgeführt. Die HLA*02:01⁺ T2 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des entsprechenden Peptids inkubiert und die Lyse der T2 Zellen nach einem Tag per Durchflusszytometrie analysiert. Für eine effektive Lyse der T2 Zellen war eine NPM1_{CLA}-Peptidkonzentration von 10⁻⁸ bis 10⁻⁶ mol/l notwendig, während bei geringeren Konzentrationen kaum Lyse stattgefunden hat. Bei WT1_{VLD} gepulsten T2 Zellen konnte eine hohe Zytotoxizität in einem Konzentrationsbereich von 10⁻⁷ bis 10⁻⁵ mol/l beobachtet werden.

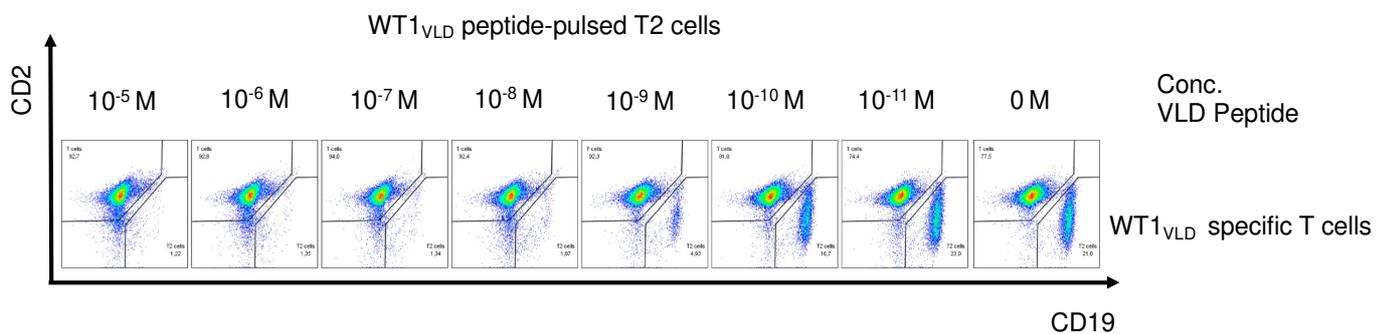


Abbildung 6 WT1_{VLD}-spezifische T Zellen lysieren Peptid-gepulste T2 Zellen

T2 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des WT1_{VLD}-Peptids gepulst und 24 Stunden lang mit WT1_{VLD}-spezifischen oder gesunden Spender T-Zellen (im Falle von NPM1) im Verhältnis 1:4 kultiviert. Die Zellyse wurde durch die Bestimmung der lysierten CD19⁺ T-Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie festgestellt.

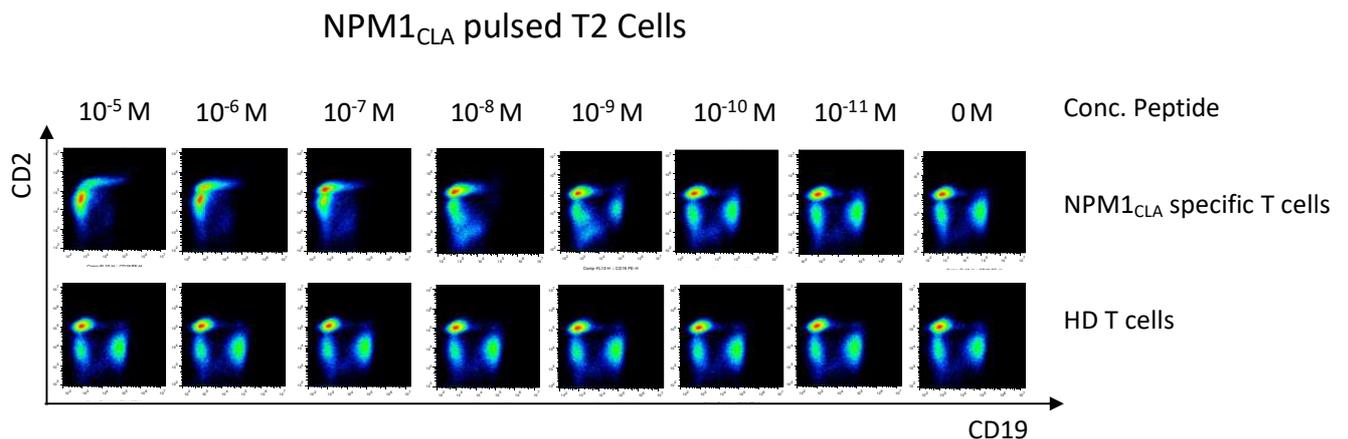


Abbildung 7 NPM1_{CLA}-spezifische T Zellen lysieren Peptid-gepulste T2 Zellen
T2-Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des NPM1_{CLA}-Peptids gepulst und 24 Stunden lang mit NPM1_{CLA}-spezifischen oder gesunden Spender-T-Zellen im Verhältnis 1:4 kultiviert.

6.5 Kokultur mit AML-Zelllinien

In Kapitel 6.4. konnte bereits gezeigt werden, dass eine Lyse von gepulsten T2-Zellen durch die WT1_{VLD} sowie NPM1_{CLA} spezifischen T-Zellen stattgefunden hat. Ein weiterer Nachweis für funktionsfähige T-Zellen erfolgte in vitro mittels primärer Zelllinien. Als Kontrolle für WT1_{VLD} spezifische Zellen wurden HL60 Zellen verwendet, welche HLA*02:01 negativ und WT1 negativ sind. Sowohl ungepulste als auch mit WT1_{VLD}-Peptid gepulste HL60 Zellen wurden nicht lysiert. Die BV-173 Zelllinien wurde als HLA*02:01 positive sowie WT1 positive Zelllinie verwendet, um eine Toxizität der spezifischen Zellen gegenüber AML Zelllinien zu demonstrieren. Während bei gesunden Spendern sowohl ohne, als auch mit Peptid keine Lyse sichtbar war, konnte mit WT1 spezifischen T-Zellen eine Lyse der AML-Zellen beobachtet werden.

Auch mit HLA-A*02:01⁺ primären AML Zellen, welche eine WT1 Expression aufwiesen, wurde eine Lyse der AML Zellen durch die WT1-spezifischen T-Zellen beobachtet (Abbildung 8).

Tumor cell line	HL60	BV-173	Primary AML cells
HLA-A*02:01	-	+	+
WT1 Mutation	-	+	+

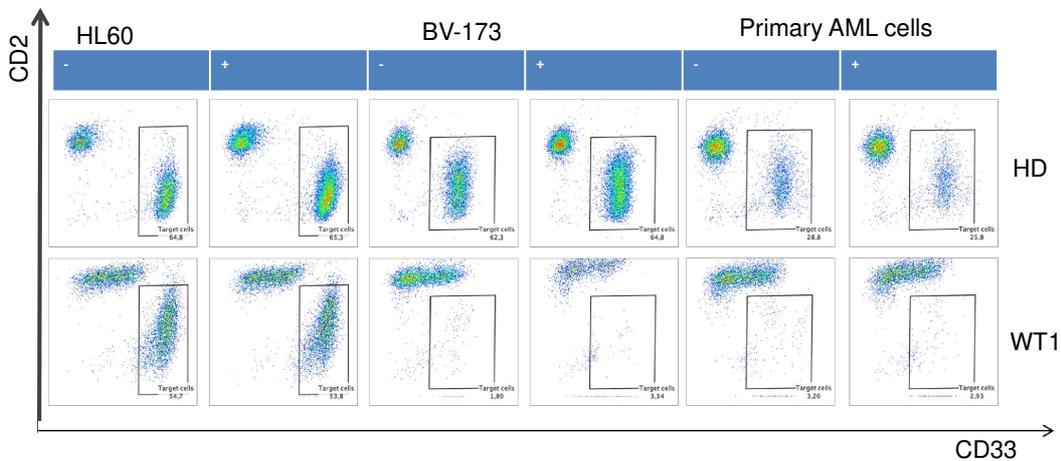


Abbildung 8 WT1_{VLD} spezifische Zellen lysieren AML Zellen

In einem weiteren Zytotoxizitätstest wurden NPM1_{CLA}-TCR transgene T-Zellen getestet. Dabei wurden HLA-A*02:01⁻ NPM1^{wt/wt} MOLM13-Zellen als Negativkontrolle verwendet, wobei keine Lyse stattfand. Mit HLA-A*02:01⁺ NPM1^{wt/wt} SKM1 Zellen, wurde eine leicht verminderte Anzahl an AML Zellen detektiert, im Vergleich zur Kokultur mit unspezifischen T-Zellen. Als Positivkontrolle wurden HLA-A*02:01⁺ NPM1^{mut} OCI-AML 3 Zellen verwendet (146), welche durch die NPM1-spezifischen T-Zellen nahezu komplett lysiert wurden (Abbildung 9).

Tumor cell line	MOLM 13	SKM1	OCI-AML3
HLA-A*02:01	-	+	+
NPM1 Mutation	-	-	+

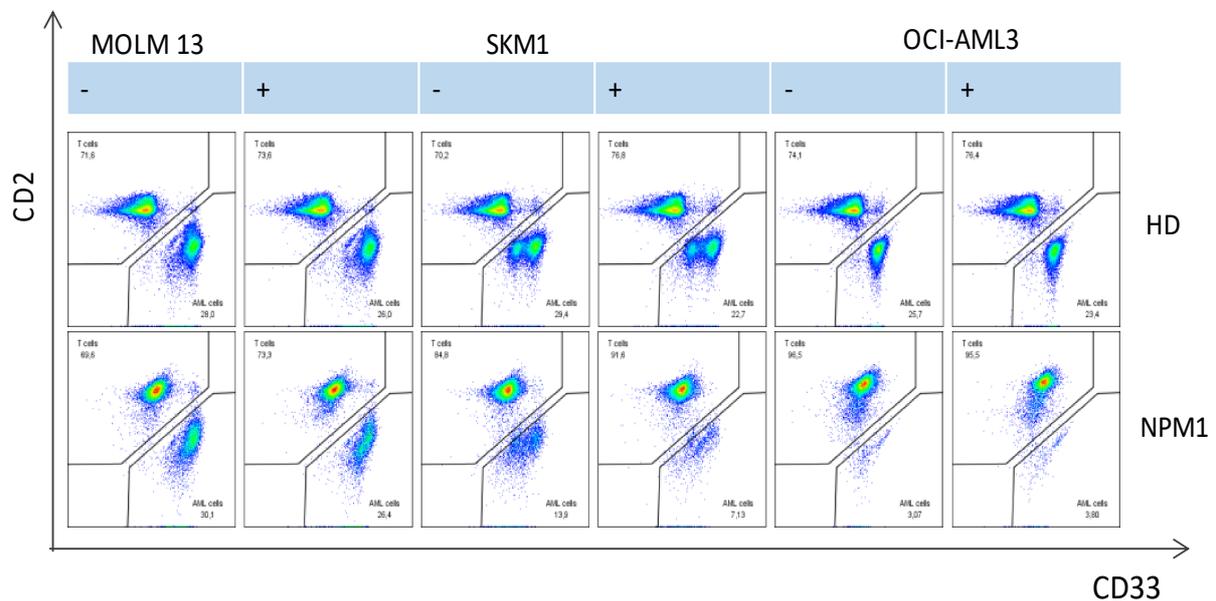


Abbildung 9 Lyse in AML-Zelllinien

T-Zellen, die mit einem NPM1_{CLA}-spezifischen T-Zell-Rezeptor transduziert wurden, lysieren NPM1_{CLA}- und HLA-A*02:01-positive AML-Zelllinien

6.6 Kokultur mit CD34+ Knochenmarkszellen

Da WT1 auch im gesunden Knochenmark exprimiert wird, wurde die „on-target off-tumor“ Toxizität der WT1-spezifischen T-Zellen in Kokulturen mit CD34+ mononukleären Knochenmarkszellen getestet, welche zusätzlich mit WT1_{VLD}-Peptid gepulst wurden. Mit CD3+ T-Zellen machten CD34+ Knochenmarkszellen 38 % (gepulst) bzw. 32 % (ungepulst) der viablen Zellen am Ende des Zytotoxizitätstest aus. Genauso wurde mit WT1-spezifischen T-Zellen nur eine geringe Lyse von ungepulsten CD34+ Knochenmarkszellen beobachtet, während WT1_{VLD}-Peptid gepulste Knochenmarkszellen fast komplett durch WT1-spezifische T-Zellen lysiert wurden (Anteil Knochenmarkszellen an viablen Zellen: 27 % versus 3 %) (Abbildung 10). Als Kontrolle wurde parallel die Lyse von ungepulsten und WT1_{VLD}-Peptid gepulsten T2-Zellen getestet, wobei im Falle der gepulsten T2 Zellen eine eindeutige Lyse sichtbar war, während die ungepulste Population bestehen blieb. In einer Kokultur von T2 Zellen zusammen mit CD3+ Zellen fand im Gegensatz dazu gar keine Lyse statt.

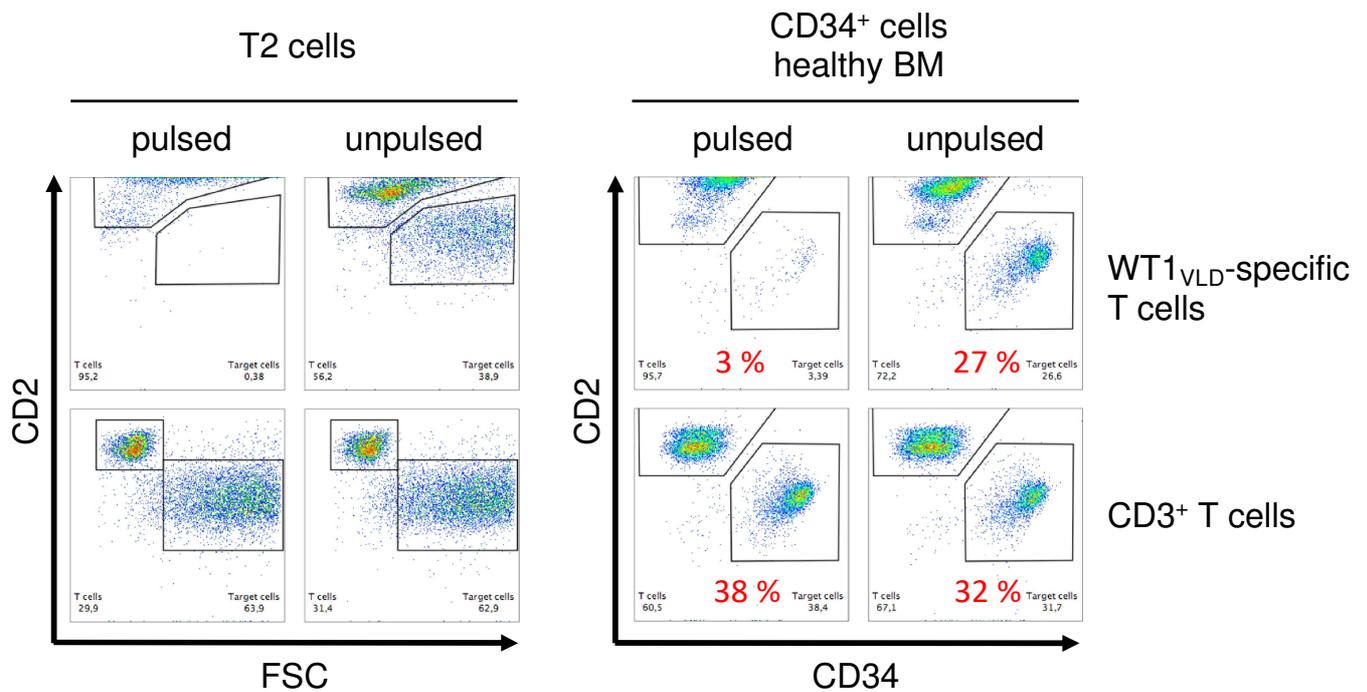


Abbildung 10 Kokultur mit CD34⁺ Knochenmarkszellen

WT1_{VLD} spezifische T-Zellen lysieren nur wenig gesunde ungepulste CD34⁺ Knochenmarkszellen (rechts). Als Kontrolle diente eine Kokultur mit T2 Zellen und WT1-spezifischen T-Zellen, wo nur bei gepulsten Zellen eine Lyse sichtbar war (links).

6.7 Antikörper-vermittelte Peptid-spezifische T-Zell-Aktivierung in allogenen DC/T Zellkulturen

Die Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden generiert, um die Funktionalität des Peptid-gekoppelten α CD40 Antikörpers zu testen. Dazu wurden unreife beziehungsweise reife dendritische Zellen mit verschiedenen α CD40-Antikörpervarianten stimuliert und im Anschluss mit allogenen Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kokultiviert. Die T-Zell-Aktivierung, gemessen als IFN- γ und TNF- α Produktion, diente dabei als Nachweis für die Peptid-Präsentation durch die DZs.

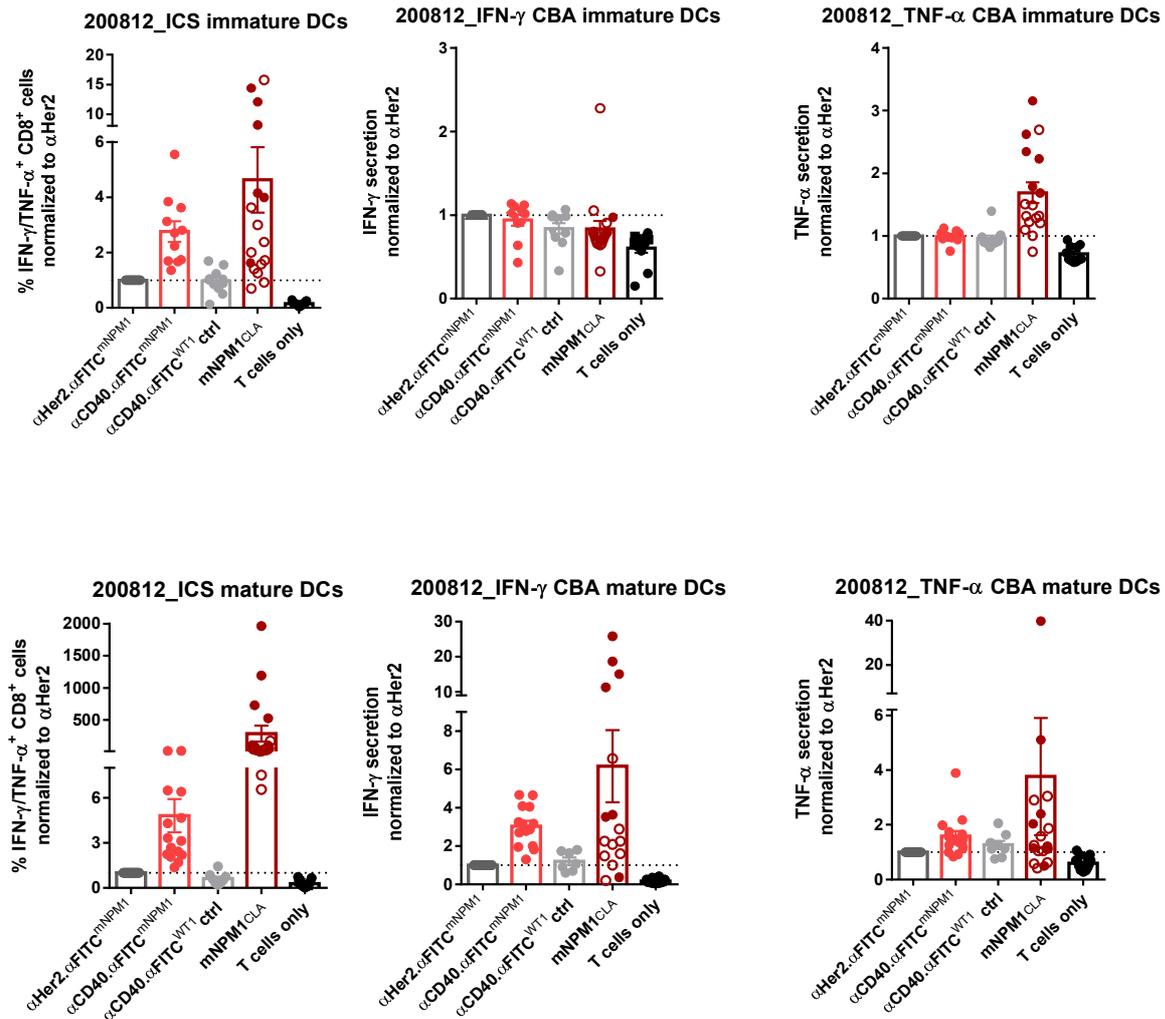


Abbildung 11 AK-vermittelte Peptid-spezifische T-Zell-Aktivierung

Allogene Kokultur mit NPM1_{CLA}-spezifischen T-Zellen und HLA-A* 02:01 positiven DZ, welche mit den verschiedenen Antikörperkonstrukten vorinkubiert wurden, in einem Verhältnis von 5:1.

In den Abbildungen werden jeweils unreife iDZ mit reifen mDZ verglichen. Die DZ wurden zuvor entweder mit dem αCD40.αFITC^{NPM1} Antikörper, mit dem αCD40.αFITC^{WT1} Antikörper, dem αHer2.αFITC^{mNPM1} Antikörper oder mit dem NPM1^{CLA} Peptid beladen. Der αCD40.αFITC^{WT1} Antikörper wurde mit einem Kontrollpeptid konjugiert, da auch eine αCD40-abhängige Reifung zu einer T-Zell-Aktivierung führen kann. Die αHer2-Kontrollen dienten als Vergleich, um unspezifische Bindungen ausschließen zu können. Eine T-Zell-Aktivierung wurde sowohl durch

intrazelluläre Färbung (ICS) von IFN- γ sowie TNF α , als auch durch eine Messung der beiden Zytokine im Überstand mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Mit unreifen DZ konnte eine vermehrte Zytokinsekretion im ICS mit dem NPM1-spezifischen Antikörper im Vergleich zu den anderen Antikörpern gesehen werden. Die NPM1-Peptidbeladung alleine diente die Positivkontrolle mit reichlicher Zytokinausschüttung. Im CBA stellte sich keine vermehrte Zytokinausschüttung im Vergleich zu den anderen Antikörpern dar. In den Versuchen mit reifen DZ zeigte sich sowohl im ICS als auch im CBA eine vermehrte Sekretion von IFN- γ sowie TNF α . Eine CD40-unspezifische Reaktion war sowohl mit unreifen als auch mit reifen DZs nicht zu sehen.

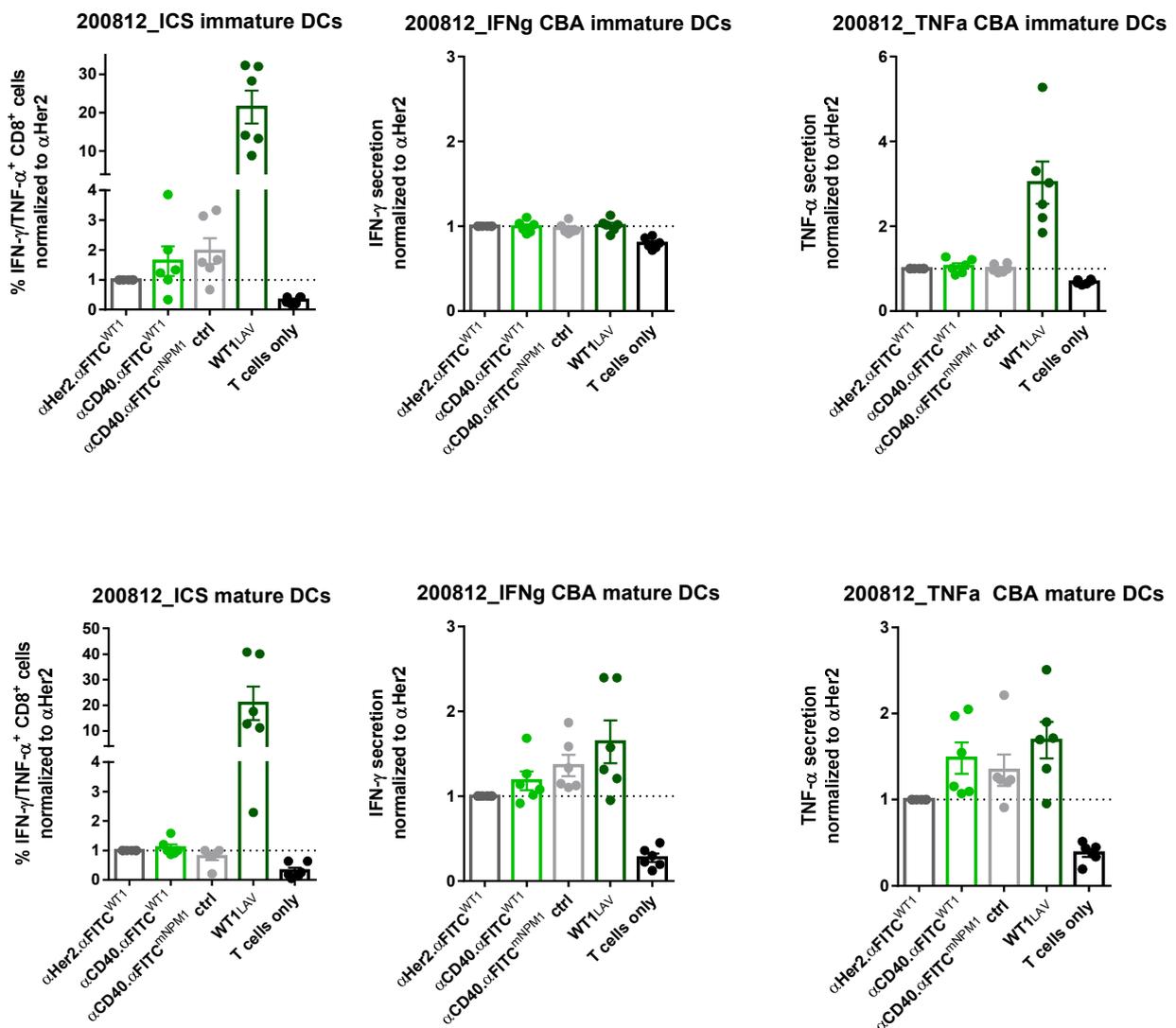


Abbildung 12 Allogene Kokultur mit WT1_{VLD}-spezifischen Zellen

Allogene Kokultur von WT1_{VLD}-spezifischen T-Zellen und vorinkubierten reifen sowie unreifen DZ mit verschiedenen Antikörperkonstrukten in einem 5:1 Verhältnis.

Die Vorinkubation der DZ erfolgte entweder mit dem α CD40. α FITC^{WT1}, mit dem α Her2. α FITC^{WT1}, dem Kontrollantikörper α CD40. α FITC^{mNPM1} oder mit dem WT1 Peptid allein. Die Auswertung erfolgte mittels T-Zell-Aktivierung durch Messung von IFN- γ sowie TNF α im ICS sowie CBA. Die alleinige Zugabe von WT1 Peptid konnte eine Spezifität der Zellen beweisen. Außerdem war keine unspezifische Aktivierung durch den CD40-Antikörper allein zu sehen. In der Kokultur mit unreifen DZ, als auch mit reifen DZ konnten keine Unterschiede zwischen den Antikörpern gesehen werden.

7 Diskussion

7.1 Isolation und Expansion von Peptid-spezifischen T-Zellen

In dieser Arbeit wurden Antigen-spezifische T-Zellen generiert, welche gegen WT1 und NPM1 Antigene gerichtet sind. Die Isolation sowie Expansion von WT1_{VLD} spezifischen T-Zellen war effizient möglich, im Gegensatz zu NPM1_{AIQ} spezifischen T-Zellen. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der Literatur (97, 98, 143). Eine Ursache könnte sein, dass NPM1_{AIQ} zu den Neoantigenen zählt und daher nur wenige antigen-spezifische T-Zellen im Körper vorhanden sind. Van der Lee et al. haben TCR transduzierte T-Zellen (TCR) entwickelt, nachdem sich eine reine Isolation sowie Expansion als Herausforderung darstellte. Dazu wurden NPM1 Peptide aus AML Proben identifiziert und in gesunden Spendern NPM1-spezifische T-Zellen mit Tetrameren isoliert und anschließend T-Zellklone gebildet (98).

Bei der Isolation von Neoantigen-spezifischen T-Zellen könnte zudem die Reinheit des Peptids eine Rolle spielen. Wir beobachteten, dass mit einem weniger aufgereinigten NPM1-Peptid weniger CD8⁺ T-Zellen IFN- γ produzierten als mit einem stärker aufgereinigten NPM1-Peptid. Zudem wäre es für eine Isolation von NPM1 spezifischen T-Zellen eventuell sinnvoll, vor Isolation die gesunden Spender auf eine Mutation im NPM1 Gen zu testen. Es ist möglich, dass bei vielen gesunden Spendern eine solche Mutation nicht vorhanden war und daher auch nicht isoliert werden konnte.

Als Alternative zu gesunden Spendern wäre eine Isolation von NPM1 spezifischen T-Zellen direkt aus Blutproben von AML Patienten mit einer solchen Mutation möglich. Forghieri et al. konnten nach Stimulation mit NPM1 Peptiden bei AML Patienten erfolgreich T-Zell-Antworten gegenüber NPM1 demonstrieren (147). Diese Zellen könnten im Anschluss isoliert werden. Woolthuis et al. konnten aus CD34⁺ Knochenmarkszellen eine NPM1-spezifische Population expandieren, wodurch diese Methode auch eine Option zur Expansion wäre (148). Zusätzlich könnten die Konzentrationen von Zellen und Zytokinen optimiert werden, um die Ausbeute an NPM1-spezifischen T-Zellen zu erhöhen (149). Eine Änderung des Expansionsprotokolls könnte die Expansion möglicherweise verbessern. Rasmussen et al. konnten spezifische T-Zellen mittels Dynabeads CD3/CD28 rasch expandieren (150). Zhang et al. haben synthetische APCs generiert, welche eine Expansion oder Anreicherung von T-Zell-Klonen in weniger als zwei Wochen ermöglicht (151).

Die von uns isolierten T-Zellen sollten als Instrument für Kokulturversuche zum Nachweis von unterschiedlichen Therapien dienen.

Die Zellen wurden vor allem zur Validierung eines *in vivo* DZ Vakzinierungsantikörper eingesetzt. Ziel war es, die Aktivierung von antigen-spezifischen T-Zellen zu messen. Dazu musste eine Peptidpräsentation auf DZs nachgewiesen werden, die mit dem α CD40-DZ Antikörperkonstrukts aktiviert wurden. Für die Überprüfung des *in vivo* α CD40-DZ Antikörperkonstrukts wurde für WT1 der von uns generierte Klon verwendet. Im Fall von NPM1 wurden zur Validierung die TCR transduzierten T-Zellen von Van der Lee et al. verwendet, nachdem unser generierter Klon nicht adäquat expandiert werden konnte (98).

7.2 Wahl des geeigneten Antigens für AML Impfung

In den letzten Jahren wurden vor allem durch Sequenzierungsanalysen eine Vielzahl von neuen Antigenen entdeckt, gegen welche eine Immunreaktion durch T-Zellen ausgelöst werden konnte (152). Diese Erkenntnisse dienten als Motivation, antigen-spezifische T-Zellen zu generieren, welche gegen neu identifizierte Antigene gerichtet sind. Zur Validierung unseres Ansatzes wählten wir zwei verschiedene Antigene aus.

WT1 ist eines der ersten identifizierten Tumor-assoziierten Antigene und wurde bereits in vielen Studien als Zielantigen untersucht (77, 83, 153). Durch WT1-Mutationen entstehen zudem viele Peptidsequenzen, welche das Potential tragen, T-Zell-Antworten hervorzurufen. Das von uns gewählte Peptid WT1_{VLD} zeigte in Versuchen von Smithgall et al. (ASH Meeting 2001) eine gute Wirksamkeit mit hoher IFN- γ Sekretion durch T-Zellen. Rezvani et al. konnten die Immunreaktion auf das WT1_{VLD} Peptid auch mittels RT-PCR sowie IFN- γ Erhöhung nachweisen (73). In anderen Studien zeigten sich allerdings auch viele andere Peptidsequenzen als die von uns ausgewählte mit herausragenden Immunreaktionen (154). Es gilt daher zu überlegen, ob eine andere Sequenz im gleichen Setting eine verbesserte Wirksamkeit zeigen würde.

Auch NPM1 erwies sich in anderen Publikationen bereits als vielversprechendes Zielantigen (97, 98, 143), wobei die Immunantworten abhängig von den ausgewählten Epitopen waren (143). Mit dem NPM1_{CLA}-Peptid konnten wir in einigen Versuchen Immunantworten beobachten. Van der Lee et al. konnten zudem eine antitumorale Wirkung von NPM1_{CLA} TCR-tansduzierten T-Zellen im Mausmodell nachweisen (98).

NPM1-Mutationen kommen in rund 30 % der AML-Patienten vor und bilden durch die Beschränkung auf maligne Zellen ein hervorragendes Zielantigen (45, 88, 89). Durch NPM1-Mutationen werden zudem Neoantigenen generiert, die als nicht-synonyme Mutationen ausschließlich in Tumorzellen exprimiert und vom eigenen Körper als fremd erkannt werden, wodurch es in Folge zu T-Zell-Antworten und Lysierung von Tumorzellen kommt (87). Durch zytoplasmatische Dislokation von NPM1 kann der Proteinabbau begünstigt werden, wodurch die Präsentation auf HLA und in Folge auch T-Zell-Antworten verstärkt werden (155). Durch Mutationen können, wie bereits erwähnt, neue Antigene generiert werden, wobei nicht alle Neoantigene auf MHC Komplexen präsentiert werden.

Neben den in dieser Arbeit untersuchten Antigenen werden für DZ Vakzinierungen noch weitere Antigene in Betracht gezogen. Zum Einsatz kam zum Beispiel auch das Antigen NY-ESO-1, welches bereits in einer klinischen Studie untersucht wurde (156). In dieser Phase 1 Studie wurde bei Patienten vor allem mit Melanomentumoren, ein Impfstoff verabreicht, welcher mit dem Tumorantigen NY-ESO-1 fusioniert wurde. Der Impfstoff zeigte eine humorale sowie zelluläre Immunität mit Bildung von Antikörpern und hohen IFN- γ Sekretionen und kaum Nebenwirkungen in der Therapie.

Auch die Identifikation von neuen Patienten-spezifischen Neoantigenen steht aktuell im Fokus der Forschung. Sahin et al. haben bei Melanompatienten individuelle Neoantigene identifiziert und eine RNA-Impfung gegen diese Epitope erfolgreich durchgeführt (54). Dieser Ansatz ließ sich vor allem bei soliden Tumoren mit hoher Mutationslast gut anwenden. Jedoch sind generell breiter einsetzbare, nicht individuelle Antigene besser für die Therapieentwicklung geeignet, weil diese für mehrere Patienten statt individuell für jeden einzelnen Patienten angewendet werden können.

7.3 Zielzellen von Impfungen

Neben der Auswahl des optimalen Zielantigens, ist die Peptidpräsentation auf MHC I oder MHC II abhängig von der Peptidsequenz wichtig für den Impferfolg. Die meisten Studien haben ihren Fokus im Bereich der Neoantigene auf CD8+ T-Zellen gesetzt. CD8+ T-Zellen werden durch DZs über *Antigen-Kreuzpräsentation* auf MHC I Moleküle aktiviert. Die CD8+ T-Zellen sind anschließend in der Lage, die Tumorzellen direkt zu lysieren. In Studien wurde allerdings beobachtet, dass auch CD4+ T-Zell-Antworten gegenüber Neoantigenen bereits in vielen Tumorentitäten nachgewiesen wurden (157,

158). Eine durchgeführte Neoantigen-Impfung im Mausmodell bestätigte eine CD4+ T-Zell-Antwort auf die Vakzinierung (159). Außerdem sind CD4+ T-Zellen in der Lage, nach Aktivierung durch eine Impfung Zytokine zu produzieren, welche zu CD8+ T-Zellproliferation führen (160).

Eine Impfung, welche gleichzeitig sowohl CD8+ als auch CD4+ T-Zellen mobilisiert, wäre ein interessanter Ansatz. Der von uns gewählte Antikörper könnte sich durch gleichzeitiges Abzielen auf beide T-Zellentitäten in seiner Wirksamkeit potenzieren. Dies hätte dann nicht nur direkte zytotoxische Effekte auf den Tumor über CD8+ T-Zellen, sondern würde auch das Potential einer Langzeitimmunisierung durch aktivierte B-Zellen hervorbringen (161).

7.4 Klinischer Erfolg von Vakzinierungsstrategien

In den letzten Jahren wurden sowohl Peptidimpfstoffe als auch DZ Vakzinierungen für verschiedenste Indikationen getestet (51, 55, 125, 132). Dabei zeigten Peptidimpfstoffe bislang eine nicht ausreichende klinische Wirksamkeit. Dies könnte unter anderem damit zu tun haben, dass meist nicht mutierte körpereigene Antigene zum Einsatz kamen. Gegen körpereigene Antigene sind zumeist keine oder nur sehr wenige antigen-spezifischen T-Zellen vorhanden aufgrund deren Deletion im Thymus zur Vermeidung einer Autoimmunität. Wir haben aus diesem Grund gezielt zwei häufig vorkommende Mutationen in WT1 und NPM1 ausgewählt, gegen welche keine T-Zell-Toleranz vorhanden sein sollte.

Tumore sind allerdings in der Lage, auch unterschiedliche Mechanismen gegen mutierte Antigene zu entwickeln, mit denen sie den antigen-spezifischen T-Zellen entkommen. Dies kann durch den Verlust der Antigenexpression oder durch Verlust des HLA-Locus passieren (45).

Eine Kombination aus unterschiedlichen Antigenen beziehungsweise Immuntherapien erscheint sinnvoll, damit Tumore keine Resistenzen gegenüber Monotherapien entwickeln können und eine Immunantwort über mehrere Zielantigene ablaufen kann und so ihre Wirkung verstärken könnte (162). Vielversprechend erscheint zudem die DZ-Vakzinierung in Kombination mit einer weiteren Immunmodulation. In einem Mausmodell konnte eine verbesserte Wirksamkeit bei Kombination von Peptidvakzinierung mit einer Checkpointblockade mittels PD-L1 gezeigt werden (163). Beim Melanom wurden in einer Phase III Studie durch computergestützte Vorhersagen multiple patientenspezifische Neoantigene identifiziert und den Patienten

anschließend als Impfung verabreicht, was in einer T-Zell-Antwort resultierte. Ein Patient dieser Studie zeigte sogar eine CR nach Impfung mit individuellen Tumorantigenen kombiniert mit PD-L1 Blockade (54). Nachdem Kombinationen aus Immuncheckpoint-Blockade und Zellvakzinierung die besten Erfolge gezeigt haben, könnte eine Kombinationstherapie auch bei unserem Behandlungsansatz versucht werden (51, 164).

7.5 Vergleich von *ex vivo* mit *in vivo* DZ Impfung

DZs spielen in ihrer Funktion als Antigenpräsentierende Zellen sowie zur Aktivierung von T-Zellen eine wichtige Rolle in der Immuntherapie. Bei einer Impfung mit dendritischen Zellen sollen Tumorantigene auf MHC Komplexe präsentiert werden. Die T-Zell-Reaktion auf die Antigene führt dann im besten Fall zu einer Tumorelimination beziehungsweise einer Tumorverkleinerung. In der DZ Vakzinierung unterscheidet man zwischen der *ex vivo* und der *in vivo* Methode.

Große Vorteile in der *in vivo* Vakzinierung bestehen in einer einfachen Anwendung bei gleichzeitig größerer Produktionsmenge. Die Antikörper sind off-the-shelf und es muss nicht wie bei der *ex vivo* Impfung für jeden Patienten ein eigenes Zellvakzin aufwendig generiert werden. Dadurch entsteht eine kostengünstigere sowie eine weniger zeitaufwendige Methode im Vergleich zur *ex vivo* Impfung. Eine gleiche Produktqualität innerhalb unterschiedlicher klinischer Zentren kann durch diese Methode außerdem gewährt werden (134).

Wie bereits erwähnt, spielt die Reifung der DZ eine wichtige Rolle (111). Während bei der *ex vivo* Vakzinierung bereits außerhalb des Körpers eine Maturierung erfolgen und kontrolliert werden kann, muss bei der *in vivo* Vakzinierung der eigene Körper dazu angeregt werden, diesen Vorgang durchzuführen. Dazu werden bestimmte Signale benötigt. DZs können physiologisch über Pattern Recognition Receptors (PRRs) oder bestimmte Ligand/Rezeptor-Interaktionen aktiviert werden, wie agonistische CD40-Antikörper, die bei DZ Vakzinierung häufig als Adjuvans verwendet werden (134). PRRs werden zuvor durch PAMPs wie TLR-Liganden aktiviert. Der Vorteil der *in vivo* Methode besteht darin, dass die Prozesse innerhalb einer komplett physiologischen Umgebung ablaufen und damit auch die meisten DZ Subtypen erreicht sowie aktiviert werden. In der *ex vivo* Impfung werden im Gegensatz nur limitiert DZ Untergruppen produziert, im Regelfall wird eine *ex vivo* Impfung daher nur mit einer bestimmten DZ

Subpopulation hergestellt. Saskia Schmitt konnte in Versuchen eine induzierte Reifung der dendritischen Zellen durch das Antikörperkonstrukt nachweisen (165).

Die Verabreichung eines zusätzlichen Adjuvans zu Maturierungszwecken kann allerdings zu einem Zytokin-Freisetzungssyndrom oder auch zu anderen unerwünschten Autoimmunreaktionen führen (166). So konnte nach Injektion eines agonistischen α CD40-Antikörpers eine Überstimulierung von B-Zellen beobachtet werden, welche als Nebenwirkung zu einer Splenomegalie führte (167). Durch simultanes Verabreichen von Antigen und Adjuvans in einem Verabreichungssystem oder in einem gekoppelten Molekül stellte sich heraus, dass überschießende Immunreaktionen deutlich seltener auftraten sowie die Effektivität erhöht wurde (168, 169). Diesen Trick verwendet auch unser Antikörperkonstrukt, bei dem an den agonistischen α CD40-Antikörper direkt die Zielsequenz des Antigens gekoppelt ist, wodurch beides zusammen in die dendritische Zelle aufgenommen wird.

Ex vivo und *in vivo* DZ-Vakzinierung können in ihrer Wirksamkeit allerdings noch nicht ausreichend verglichen werden, da im Rahmen der *in vivo* Vakzinierung nur wenige klinische Studien vorliegen. Eine Phase II Studie konnte in einem direkten Vergleich kein statistisch signifikant besseres oder schlechteres Abschneiden einer *in vivo* DZ-Vakzinierung nachweisen, im Vergleich zu einer *ex vivo* DZ-Vakzinierung. Es war aber im Allgemeinen ein besseres Gesamtüberleben bei DZ Impfung im Gegensatz zur Kontrolle ohne Therapie zu beobachten, was erneut den allgemeinen klinischen Nutzen von DZ-Vakzinierungen unterstreicht (170).

7.6 Chancen, Limitationen und Zukunftsperspektiven

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei gesunden Spendern tumor-spezifische T-Zellen *ex vivo* mit Peptid-gepulsten DZ expandiert werden konnten. Dies unterstützt die Annahme, dass *ex vivo* aktivierte und mit Peptid beladene DZ nach Impfungen zu Immunantworten mit ausreichender T-Zell-Vermehrung in Patienten führen könnten.

Die antigen-spezifischen Zellen könnten außer im Rahmen der DZ Vakzinierung auch zum Beispiel direkt für eine T-Zell-Therapie verwendet werden und dem Patienten damit unabhängig von DZ verabreicht werden (171). Die generierten T-Zellen könnten im Patienten dadurch eigenständig einen Therapieerfolg herbeiführen. Eine erfolgreiche TCR Therapie mit dem Antigen WT1 wurde bereits durch Chapuis et al. gezeigt (74). Die Zukunft der DZ Vakzinierung könnte vor allem in unterschiedlichsten Kombinationstherapien liegen. Eine Kombination von DZ Vakzinierung mit CAR-T-

Zelltherapie zeigte in diesem Zusammenhang große Erfolge. In einem Axenotransplantationsmodell wurden die beiden Immuntherapieansätze mit WT1 als Zielantigen kombiniert. Durch gleichzeitige DZ-Vakzinierung persistierten die CAR-T-Zellen und verlängerten damit die Remission nach CAR-T-Zelltherapie (172).

Eine DZ Impfung, welche gegen WT1 Mutationen oder gegen das Neoantigen NPM1 gerichtet ist, ist aufgrund der Auftretenswahrscheinlichkeit in circa 30 % der Patienten anwendbar. Außerdem setzt die Therapie voraus, dass Patienten auf diese beiden Mutationen getestet werden. Dies gehört aber mittlerweile zum diagnostischen Repertoire dazu (21, 173). Die Peptidsequenz im α CD40-Antikörper kann durch andere Epitope ausgetauscht werden, wodurch dieser Therapieansatz auch bei Patienten mit anderen Mutationen anwendbar wäre.

Der von Saskia Schmitt generierte α CD40 DZ-Antikörper zeigte in der NPM1-gekoppelten Variante eine gute Wirksamkeit, während bei der WT1-gekoppelten Variante niedrigere Mengen an IFN- γ sowie TNF- α sezerniert wurden. Dies könnte aber an der Verwendung von TCR-transduzierten T-Zellen bei NPM1 versus de novo antigen-spezifischen WT1 T-Zellen liegen. In den oben beschriebenen Versuchen wurden die TCR transduzierten T-Zellen von van der Lee et al. verwendet. Die Herstellung des CD40 Peptid-gekoppelten Antikörpers sowie die biochemische Charakterisierung wurden bereits von Saskia Schmitt in ihrer Dissertation sowie in einem Journal veröffentlicht (165). Saskia Schmitt zeigte in ihrer Doktorarbeit bereits die Kokulturversuche mit NPM1 TCR T-Zellen und α CD40 Antikörperkonstrukt, jedoch mit anderen Spendern. Möglicherweise zeigt auch der Einsatz des Neoantigens NPM1 in diesem Fall eine stärkere Immunantwort, da diese dem Körper fremd sind und in gesunden Zellen nicht vorkommen.

Die beiden ausgewählten Tumorantigene werden außerdem in aktuellen Studien noch häufig bei anderen Therapieansätzen verwendet. Augsberger et al. haben einen WT1-bispezifischen Antikörper generiert, welcher aktuell in einer Phase I Studie getestet wird (75). Außerdem finden beide Antigene Anwendung im Bereich der TCR-transgenen T-Zellen (74, 98, 174). Zusätzlich wurde NPM1 zur CAR-T Zell-Therapie eingesetzt und zeigte erste Erfolge (97).

Sowohl im Bereich der Neoantigene, als auch im Bereich der DZ Impfung gab es viele erfolgreiche Studien in den letzten Jahren (42, 49, 131). Beide Methoden wurden deutlich verbessert und bergen das Potential als Therapiealternative zur

Stammzelltransplantation eingesetzt zu werden (27). Außerdem eignen sich die Methoden hervorragend für eine Kombination mit anderen Immuntherapien.

Trotz allem sind noch viele weitere Optimierungen für einen Durchbruch der DZ-Vakzinierung in der Therapie der AML nötig. Unser Ansatz mit einem Peptidgekoppelten CD40-Antikörper zeigte erste vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich einer optimierten DZ-Vakzinierungsstrategie. Dieser Ansatz könnte zudem auch in anderen Tumorentitäten und mit anderen Tumorantigenen verfolgt werden.

8 Referenzen

1. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006;368(9550):1894-907.
2. Kraywinkel K, Spix C. Epidemiologie akuter Leukämien in Deutschland. *Der Onkologe*. 2017;23(7):499-503.
3. Nennecke A, Wienecke A, Kraywinkel K. Inzidenz und Überleben bei Leukämien in Deutschland nach aktuellen standardisierten Kategorien. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 2014;57(1):93-102.
4. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014;64(4):252-71.
5. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J*. 2016;6(7):e441.
6. Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;341(14):1051-62.
7. Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J* (2013). 2020;103(3):38-40.
8. Alcalay M, Orleth A, Sebastiani C, Meani N, Chiaradonna F, Casciari C, et al. Common themes in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2001;20(40):5680-94.
9. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127(1):29-41.
10. Löwenberg B, Rowe JM. Introduction to the review series on advances in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2016;127(1):1-.
11. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;107(9):3481-5.
12. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985;103(4):620-5.
13. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.

14. Neame PB, Soamboonsrup P, Browman GP, Meyer RM, Bengner A, Wilson WE, et al. Classifying acute leukemia by immunophenotyping: a combined FAB-immunologic classification of AML. *Blood*. 1986;68(6):1355-62.
15. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
16. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.
17. McKerrell T, Moreno T, Ponstingl H, Bolli N, Dias JM, Tischler G, et al. Development and validation of a comprehensive genomic diagnostic tool for myeloid malignancies. *Blood*. 2016;128(1):e1-9.
18. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-52.
19. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013;502(7471):333-9.
20. Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;127(1):53-61.
21. Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet*. 2013;381(9865):484-95.
22. Kantarjian H, Ravandi F, O'Brien S, Cortes J, Faderl S, Garcia-Manero G, et al. Intensive chemotherapy does not benefit most older patients (age 70 years or older) with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010;116(22):4422-9.
23. Stelljes M, Krug U, Beelen DW, Braess J, Sauerland MC, Heinecke A, et al. Allogeneic transplantation versus chemotherapy as postremission therapy for acute myeloid leukemia: a prospective matched pairs analysis. *J Clin Oncol*. 2014;32(4):288-96.
24. Juliusson G, Karlsson K, Lazarevic V, Wahlin A, Brune M, Antunovic P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation rates and long-term survival in acute myeloid and lymphoblastic leukemia: real-world population-based data from the Swedish Acute Leukemia Registry 1997-2006. *Cancer*. 2011;117(18):4238-46.
25. Kassim AA, Savani BN. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: A review. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2017;10(4):245-51.

26. Klepin HD, Rao AV, Pardee TS. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older adults. *J Clin Oncol.* 2014;32(24):2541-52.
27. Lichtenegger FS, Krupka C, Haubner S, Köhnke T, Subklewe M. Recent developments in immunotherapy of acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):142.
28. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med.* 2017;9(1):34.
29. Topp MS, Gökbuget N, Stein AS, Zugmaier G, O'Brien S, Bargou RC, et al. Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia: a multicentre, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2015;16(1):57-66.
30. Kantarjian H, Stein A, Gökbuget N, Fielding AK, Schuh AC, Ribera JM, et al. Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2017;376(9):836-47.
31. Sermer D, Brentjens R. CAR T-cell therapy: Full speed ahead. *Hematol Oncol.* 2019;37 Suppl 1:95-100.
32. Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, Hecht TT, et al. The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clin Cancer Res.* 2009;15(17):5323-37.
33. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science.* 2015;348(6230):69-74.
34. Greiner J, Bullinger L, Guinn BA, Döhner H, Schmitt M. Leukemia-associated antigens are critical for the proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Clin Cancer Res.* 2008;14(22):7161-6.
35. Wendelbo Ø, Nesthus I, Sjø M, Paulsen K, Ernst P, Bruserud Ø. Functional characterization of T lymphocytes derived from patients with acute myelogenous leukemia and chemotherapy-induced leukopenia. *Cancer Immunol Immunother.* 2004;53(8):740-7.
36. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol.* 2000;74:181-273.
37. Pedersen SR, Sørensen MR, Buus S, Christensen JP, Thomsen AR. Comparison of vaccine-induced effector CD8 T cell responses directed against self- and non-self-

- tumor antigens: implications for cancer immunotherapy. *J Immunol.* 2013;191(7):3955-67.
38. Ho NI, Huis In 't Veld LGM, Raaijmakers TK, Adema GJ. Adjuvants Enhancing Cross-Presentation by Dendritic Cells: The Key to More Effective Vaccines? *Front Immunol.* 2018;9:2874.
 39. Daver N, Alotaibi AS, Bücklein V, Subklewe M. T-cell-based immunotherapy of acute myeloid leukemia: current concepts and future developments. *Leukemia.* 2021;35(7):1843-63.
 40. Beyar-Katz O, Gill S. Novel Approaches to Acute Myeloid Leukemia Immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2018;24(22):5502-15.
 41. Gilboa E. The Makings of a Tumor Rejection Antigen. *Immunity.* 1999;11(3):263-70.
 42. Hollingsworth RE, Jansen K. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *NPJ Vaccines.* 2019;4:7.
 43. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, Rickert CG, Uppaluri R, Magrini VJ, et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature.* 2012;482(7385):400-4.
 44. Schumacher TN, Scheper W, Kvistborg P. Cancer Neoantigens. *Annu Rev Immunol.* 2019;37:173-200.
 45. Tran E, Robbins PF, Rosenberg SA. 'Final common pathway' of human cancer immunotherapy: targeting random somatic mutations. *Nat Immunol.* 2017;18(3):255-62.
 46. Anguille S, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Leukemia-associated antigens and their relevance to the immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2012;26(10):2186-96.
 47. Stirewalt DL, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(9):650-65.
 48. Lennerz V, Fatho M, Gentilini C, Frye RA, Lifke A, Ferel D, et al. The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(44):16013-8.
 49. Jiang T, Shi T, Zhang H, Hu J, Song Y, Wei J, et al. Tumor neoantigens: from basic research to clinical applications. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):93.
 50. Freudenmann LK, Marcu A, Stevanović S. Mapping the tumour human leukocyte antigen (HLA) ligandome by mass spectrometry. *Immunology.* 2018;154(3):331-45.

51. Ott PA, Hu Z, Keskin DB, Shukla SA, Sun J, Bozym DJ, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature*. 2017;547(7662):217-21.
52. Finn OJ, Rammensee HG. Is It Possible to Develop Cancer Vaccines to Neoantigens, What Are the Major Challenges, and How Can These Be Overcome? *Neoantigens: Nothing New in Spite of the Name*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018;10(11).
53. Stevanović S, Draper LM, Langan MM, Campbell TE, Kwong ML, Wunderlich JR, et al. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. *J Clin Oncol*. 2015;33(14):1543-50.
54. Sahin U, Derhovanessian E, Miller M, Kloke BP, Simon P, Löwer M, et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature*. 2017;547(7662):222-6.
55. Keskin DB, Anandappa AJ, Sun J, Tirosh I, Mathewson ND, Li S, et al. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. *Nature*. 2019;565(7738):234-9.
56. Armistead PM. Cellular therapy against public neoantigens. *J Clin Invest*. 2019;129(2):506-8.
57. Roerden M, Nelde A, Walz JS. Neoantigens in Hematological Malignancies-Ultimate Targets for Immunotherapy? *Front Immunol*. 2019;10:3004.
58. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*. 1990;343(6260):774-8.
59. Di Stasi A, Jimenez AM, Minagawa K, Al-Obaidi M, Rezvani K. Review of the Results of WT1 Peptide Vaccination Strategies for Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia from Nine Different Studies. *Front Immunol*. 2015;6:36.
60. Yang L, Han Y, Suarez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*. 2007;21(5):868-76.
61. Sugiyama H. WT1 (Wilms' tumor gene 1): biology and cancer immunotherapy. *Jpn J Clin Oncol*. 2010;40(5):377-87.
62. Potluri S, Assi SA, Chin PS, Coleman DJL, Pickin A, Moriya S, et al. Isoform-specific and signaling-dependent propagation of acute myeloid leukemia by Wilms tumor 1. *Cell Rep*. 2021;35(3):109010.

63. Oka Y, Udaka K, Tsuboi A, Elisseeva OA, Ogawa H, Aozasa K, et al. Cancer immunotherapy targeting Wilms' tumor gene WT1 product. *J Immunol.* 2000;164(4):1873-80.
64. Shandilya J, Toska E, Richard DJ, Medler KF, Roberts SG. WT1 interacts with MAD2 and regulates mitotic checkpoint function. *Nat Commun.* 2014;5:4903.
65. Nishida S, Hosen N, Shirakata T, Kanato K, Yanagihara M, Nakatsuka S, et al. AML1-ETO rapidly induces acute myeloblastic leukemia in cooperation with the Wilms tumor gene, WT1. *Blood.* 2006;107(8):3303-12.
66. Chau YY, Brownstein D, Mjoseng H, Lee WC, Buza-Vidas N, Nerlov C, et al. Acute multiple organ failure in adult mice deleted for the developmental regulator Wt1. *PLoS Genet.* 2011;7(12):e1002404.
67. Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, Karakas T, Weidmann E, et al. High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome. *Blood.* 1997;90(3):1217-25.
68. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrózek K, Maharry K, et al. Wilms' tumor 1 gene mutations independently predict poor outcome in adults with cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol.* 2008;26(28):4595-602.
69. Virappane P, Gale R, Hills R, Kakkas I, Summers K, Stevens J, et al. Mutation of the Wilms' tumor 1 gene is a poor prognostic factor associated with chemotherapy resistance in normal karyotype acute myeloid leukemia: the United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *J Clin Oncol.* 2008;26(33):5429-35.
70. Maurer U, Weidmann E, Karakas T, Hoelzer D, Bergmann L. Wilms tumor gene (wt1) mRNA is equally expressed in blast cells from acute myeloid leukemia and normal CD34+ progenitors. *Blood.* 1997;90(10):4230-2.
71. Greiner J, Schmitt M, Li L, Giannopoulos K, Bosch K, Schmitt A, et al. Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches. *Blood.* 2006;108(13):4109-17.
72. Hou HA, Huang TC, Lin LI, Liu CY, Chen CY, Chou WC, et al. WT1 mutation in 470 adult patients with acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and implication of its incorporation into a survival scoring system. *Blood.* 2010;115(25):5222-31.

73. Rezvani K, Brenchley JM, Price DA, Kilical Y, Gostick E, Sewell AK, et al. T-cell responses directed against multiple HLA-A*0201-restricted epitopes derived from Wilms' tumor 1 protein in patients with leukemia and healthy donors: identification, quantification, and characterization. *Clin Cancer Res.* 2005;11(24 Pt 1):8799-807.
74. Chapuis AG, Egan DN, Bar M, Schmitt TM, McAfee MS, Paulson KG, et al. T cell receptor gene therapy targeting WT1 prevents acute myeloid leukemia relapse post-transplant. *Nat Med.* 2019;25(7):1064-72.
75. Augsberger C, Hänel G, Xu W, Pulko V, Hanisch LJ, Augustin A, et al. Targeting intracellular WT1 in AML with a novel RMF-peptide-MHC specific T-cell bispecific antibody. *Blood.* 2021.
76. Tunger A, Wehner R, von Bonin M, Kühn D, Heidenreich F, Matko S, et al. Generation of high-avidity, WT1-reactive CD8+ cytotoxic T cell clones with anti-leukemic activity by streptamer technology. *Leuk Lymphoma.* 2017;58(5):1246-9.
77. Van Tendeloo VF, Van de Velde A, Van Driessche A, Cools N, Anguille S, Ladell K, et al. Induction of complete and molecular remissions in acute myeloid leukemia by Wilms' tumor 1 antigen-targeted dendritic cell vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(31):13824-9.
78. Keilholz U, Letsch A, Busse A, Asemissen AM, Bauer S, Blau IW, et al. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood.* 2009;113(26):6541-8.
79. Rezvani K, Yong AS, Mielke S, Savani BN, Musse L, Superata J, et al. Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood.* 2008;111(1):236-42.
80. Van Driessche A, Berneman ZN, Van Tendeloo VF. Active specific immunotherapy targeting the Wilms' tumor protein 1 (WT1) for patients with hematological malignancies and solid tumors: lessons from early clinical trials. *Oncologist.* 2012;17(2):250-9.
81. Shah NN, Loeb DM, Khuu H, Stroncek D, Ariyo T, Raffeld M, et al. Induction of Immune Response after Allogeneic Wilms' Tumor 1 Dendritic Cell Vaccination and Donor Lymphocyte Infusion in Patients with Hematologic Malignancies and Post-Transplantation Relapse. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2016;22(12):2149-54.

82. Maslak PG, Dao T, Bernal Y, Chanel SM, Zhang R, Frattini M, et al. Phase 2 trial of a multivalent WT1 peptide vaccine (galinpepimut-S) in acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2018;2(3):224-34.
83. Anguille S, Van de Velde AL, Smits EL, Van Tendeloo VF, Juliusson G, Cools N, et al. Dendritic cell vaccination as postremission treatment to prevent or delay relapse in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2017;130(15):1713-21.
84. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell.* 1989;56(3):379-90.
85. Kurki S, Peltonen K, Latonen L, Kiviharju TM, Ojala PM, Meek D, et al. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell.* 2004;5(5):465-75.
86. Eirín-López JM, Frehlick LJ, Ausió J. Long-term evolution and functional diversification in the members of the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Genetics.* 2006;173(4):1835-50.
87. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med.* 2005;352(3):254-66.
88. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010;115(3):453-74.
89. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2016;374(23):2209-21.
90. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2008;358(18):1909-18.
91. Rose D, Haferlach T, Schnittger S, Perglerová K, Kern W, Haferlach C. Subtype-specific patterns of molecular mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2017;31(1):11-7.
92. Verhaak RG, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association

- with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 2005;106(12):3747-54.
93. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005;106(12):3733-9.
 94. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *Jama*. 2009;301(22):2349-61.
 95. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Görlich D, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128(5):686-98.
 96. Krönke J, Schlenk RF, Jensen KO, Tschürtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol*. 2011;29(19):2709-16.
 97. Xie G, Ivica NA, Jia B, Li Y, Dong H, Liang Y, et al. CAR-T cells targeting a nucleophosmin neoepitope exhibit potent specific activity in mouse models of acute myeloid leukaemia. *Nat Biomed Eng*. 2021;5(5):399-413.
 98. van der Lee DI, Reijmers RM, Honders MW, Hagedoorn RS, de Jong RC, Kester MG, et al. Mutated nucleophosmin 1 as immunotherapy target in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 2019;129(2):774-85.
 99. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137(5):1142-62.
 100. Santos PM, Butterfield LH. Dendritic Cell-Based Cancer Vaccines. *J Immunol*. 2018;200(2):443-9.
 101. Inaba K, Romani N, Steinman RM. An antigen-independent contact mechanism as an early step in T cell-proliferative responses to dendritic cells. *J Exp Med*. 1989;170(2):527-42.
 102. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392(6673):245-52.
 103. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:621-67.

104. Mehta-Damani A, Markowicz S, Engleman EG. Generation of antigen-specific CD4+ T cell lines from naive precursors. *Eur J Immunol.* 1995;25(5):1206-11.
105. Mehta-Damani A, Markowicz S, Engleman EG. Generation of antigen-specific CD8+ CTLs from naive precursors. *J Immunol.* 1994;153(3):996-1003.
106. Mathan TS, Figdor CG, Buschow SI. Human plasmacytoid dendritic cells: from molecules to intercellular communication network. *Front Immunol.* 2013;4:372.
107. Perez CR, De Palma M. Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy. *Nat Commun.* 2019;10(1):5408.
108. Datta J, Terhune JH, Lowenfeld L, Cintolo JA, Xu S, Roses RE, et al. Optimizing dendritic cell-based approaches for cancer immunotherapy. *Yale J Biol Med.* 2014;87(4):491-518.
109. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(8):557-69.
110. Smits EL, Lee C, Hardwick N, Brooks S, Van Tendeloo VF, Orchard K, et al. Clinical evaluation of cellular immunotherapy in acute myeloid leukaemia. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(6):757-69.
111. Skalova K, Mollova K, Michalek J. Human myeloid dendritic cells for cancer therapy: does maturation matter? *Vaccine.* 2010;28(32):5153-60.
112. Tacke PJ, de Vries IJ, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(10):790-802.
113. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* 2006;441(7089):101-5.
114. Pedra JH, Cassel SL, Sutterwala FS. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr Opin Immunol.* 2009;21(1):10-6.
115. Huber A, Dammeijer F, Aerts J, Vroman H. Current State of Dendritic Cell-Based Immunotherapy: Opportunities for in vitro Antigen Loading of Different DC Subsets? *Front Immunol.* 2018;9:2804.
116. Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.* 1997;27(12):3135-42.

117. Subklewe M, Geiger C, Lichtenegger FS, Javorovic M, Kvalheim G, Schendel DJ, et al. New generation dendritic cell vaccine for immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2014;63(10):1093-103.
118. Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, et al. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol*. 2003;170(8):4069-76.
119. Sabado RL, Balan S, Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res*. 2017;27(1):74-95.
120. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 2018;154(1):3-20.
121. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology*. 2013;140(1):22-30.
122. Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(2):89-103.
123. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol*. 2012;13(12):1145-54.
124. Lutz MB, Strobl H, Schuler G, Romani N. GM-CSF Monocyte-Derived Cells and Langerhans Cells As Part of the Dendritic Cell Family. *Front Immunol*. 2017;8:1388.
125. Schmitt M, Casalegno-Garduño R, Xu X, Schmitt A. Peptide vaccines for patients with acute myeloid leukemia. *Expert Rev Vaccines*. 2009;8(10):1415-25.
126. Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M, Desai H, Fossella C, Krasovskiy J, et al. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest*. 1999;104(2):173-80.
127. Draube A, Klein-González N, Mattheus S, Brilliant C, Hellmich M, Engert A, et al. Dendritic cell based tumor vaccination in prostate and renal cell cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2011;6(4):e18801.
128. Lichtenegger FS, Schnorfeil FM, Rothe M, Deiser K, Altmann T, Bücklein VL, et al. Toll-like receptor 7/8-matured RNA-transduced dendritic cells as post-remission therapy in acute myeloid leukaemia: results of a phase I trial. *Clin Transl Immunology*. 2020;9(3):e1117.
129. Rosenblatt J, Stone RM, Uhl L, Neuberg D, Joyce R, Levine JD, et al. Individualized vaccination of AML patients in remission is associated with induction of antileukemia immunity and prolonged remissions. *Sci Transl Med*. 2016;8(368):368ra171.

130. Mehrotra S, Britten CD, Chin S, Garrett-Mayer E, Cloud CA, Li M, et al. Vaccination with poly(IC:LC) and peptide-pulsed autologous dendritic cells in patients with pancreatic cancer. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):82.
131. Wesley JD, Whitmore J, Trager J, Sheikh N. An overview of sipuleucel-T: autologous cellular immunotherapy for prostate cancer. *Hum Vaccin Immunother*. 2012;8(4):520-7.
132. van de Loosdrecht AA, van Wetering S, Santegoets S, Singh SK, Eeltink CM, den Hartog Y, et al. A novel allogeneic off-the-shelf dendritic cell vaccine for post-remission treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2018;67(10):1505-18.
133. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007;449(7161):419-26.
134. Baldin AV, Savvateeva LV, Bazhin AV, Zamyatnin AA, Jr. Dendritic Cells in Anticancer Vaccination: Rationale for Ex Vivo Loading or In Vivo Targeting. *Cancers (Basel)*. 2020;12(3).
135. Seledtsov VI, Goncharov AG, Seledtsova GV. Clinically feasible approaches to potentiating cancer cell-based immunotherapies. *Hum Vaccin Immunother*. 2015;11(4):851-69.
136. Bol KF, Schreibelt G, Gerritsen WR, de Vries IJ, Figdor CG. Dendritic Cell-Based Immunotherapy: State of the Art and Beyond. *Clin Cancer Res*. 2016;22(8):1897-906.
137. Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med*. 2004;199(6):815-24.
138. Winograd R, Byrne KT, Evans RA, Odorizzi PM, Meyer AR, Bajor DL, et al. Induction of T-cell Immunity Overcomes Complete Resistance to PD-1 and CTLA-4 Blockade and Improves Survival in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(4):399-411.
139. Beatty GL, Torigian DA, Chiorean EG, Saboury B, Brothers A, Alavi A, et al. A phase I study of an agonist CD40 monoclonal antibody (CP-870,893) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2013;19(22):6286-95.
140. Sprooten J, Ceusters J, Coosemans A, Agostinis P, De Vleeschouwer S, Zitvogel L, et al. Trial watch: dendritic cell vaccination for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2019;8(11):e1638212.

141. Moreno Ayala MA, Gottardo MF, Imsen M, Asad AS, Bal de Kier Joffé E, Casares N, et al. Therapeutic blockade of Foxp3 in experimental breast cancer models. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;166(2):393-405.
142. Arab S, Kheshtchin N, Ajami M, Ashurpoor M, Safvati A, Namdar A, et al. Increased efficacy of a dendritic cell-based therapeutic cancer vaccine with adenosine receptor antagonist and CD73 inhibitor. *Tumour Biol.* 2017;39(3):1010428317695021.
143. Greiner J, Ono Y, Hofmann S, Schmitt A, Mehring E, Götz M, et al. Mutated regions of nucleophosmin 1 elicit both CD4+ and CD8+ T-cell responses in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2012;120(6):1282-9.
144. Lichtenegger FS, Mueller K, Otte B, Beck B, Hiddemann W, Schendel DJ, et al. CD86 and IL-12p70 are key players for T helper 1 polarization and natural killer cell activation by Toll-like receptor-induced dendritic cells. *PLoS One.* 2012;7(9):e44266.
145. Wöflfl M, Greenberg PD. Antigen-specific activation and cytokine-facilitated expansion of naive, human CD8+ T cells. *Nat Protoc.* 2014;9(4):950-66.
146. Quentmeier H, Martelli MP, Dirks WG, Bolli N, Liso A, Macleod RA, et al. Cell line OCI/AML3 bears exon-12 NPM gene mutation-A and cytoplasmic expression of nucleophosmin. *Leukemia.* 2005;19(10):1760-7.
147. Forghieri F, Riva G, Lagreca I, Barozzi P, Vallerini D, Morselli M, et al. Characterization and dynamics of specific T cells against nucleophosmin-1 (NPM1)-mutated peptides in patients with NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2019;10(8):869-82.
148. Woolthuis CM, Han L, Verkaik-Schakel RN, van Gosliga D, Kluin PM, Vellenga E, et al. Downregulation of MEIS1 impairs long-term expansion of CD34+ NPM1-mutated acute myeloid leukemia cells. *Leukemia.* 2012;26(4):848-53.
149. Ghaffari S, Torabi-Rahvar M, Aghayan S, Jabbarpour Z, Moradzadeh K, Omidkhoda A, et al. Optimizing interleukin-2 concentration, seeding density and bead-to-cell ratio of T-cell expansion for adoptive immunotherapy. *BMC Immunol.* 2021;22(1):43.
150. Rasmussen AM, Borelli G, Hoel HJ, Lislerud K, Gaudernack G, Kvalheim G, et al. Ex vivo expansion protocol for human tumor specific T cells for adoptive T cell therapy. *J Immunol Methods.* 2010;355(1-2):52-60.
151. Zhang DKY, Cheung AS, Mooney DJ. Activation and expansion of human T cells using artificial antigen-presenting cell scaffolds. *Nat Protoc.* 2020;15(3):773-98.
152. Hutchison S, Pritchard AL. Identifying neoantigens for use in immunotherapy. *Mamm Genome.* 2018;29(11-12):714-30.

153. Tsuboi A, Oka Y, Udaka K, Murakami M, Masuda T, Nakano A, et al. Enhanced induction of human WT1-specific cytotoxic T lymphocytes with a 9-mer WT1 peptide modified at HLA-A*2402-binding residues. *Cancer Immunol Immunother.* 2002;51(11-12):614-20.
154. Doubrovina E, Carpenter T, Pankov D, Selvakumar A, Hasan A, O'Reilly RJ. Mapping of novel peptides of WT-1 and presenting HLA alleles that induce epitope-specific HLA-restricted T cells with cytotoxic activity against WT-1(+) leukemias. *Blood.* 2012;120(8):1633-46.
155. Liso A, Colau D, Benmaamar R, De Groot A, Martin W, Benedetti R, et al. Nucleophosmin leukaemic mutants contain C-terminus peptides that bind HLA class I molecules. *Leukemia.* 2008;22(2):424-6.
156. Dhodapkar MV, Sznol M, Zhao B, Wang D, Carvajal RD, Keohan ML, et al. Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Sci Transl Med.* 2014;6(232):232ra51.
157. Linnemann C, van Buuren MM, Bies L, Verdegaal EM, Schotte R, Calis JJ, et al. High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat Med.* 2015;21(1):81-5.
158. Tran E, Ahmadzadeh M, Lu YC, Gros A, Turcotte S, Robbins PF, et al. Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers. *Science.* 2015;350(6266):1387-90.
159. Kreiter S, Vormehr M, van de Roemer N, Diken M, Löwer M, Diekmann J, et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature.* 2015;520(7549):692-6.
160. Aarntzen EH, De Vries IJ, Lesterhuis WJ, Schuurhuis D, Jacobs JF, Bol K, et al. Targeting CD4(+) T-helper cells improves the induction of antitumor responses in dendritic cell-based vaccination. *Cancer Res.* 2013;73(1):19-29.
161. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4+T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:925135.
162. Palucka K, Banchereau J. Diversity and collaboration for effective immunotherapy. *Nat Med.* 2016;22(12):1390-1.
163. Karyampudi L, Lamichhane P, Scheid AD, Kalli KR, Shreeder B, Krempski JW, et al. Accumulation of memory precursor CD8 T cells in regressing tumors following combination therapy with vaccine and anti-PD-1 antibody. *Cancer Res.* 2014;74(11):2974-85.

164. Dillman RO. Is there a role for therapeutic cancer vaccines in the age of checkpoint inhibitors? *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(3):528-32.
165. Schmitt S, Tahk S, Lohner A, Hänel G, Maiser A, Hauke M, et al. Fusion of Bacterial Flagellin to a Dendritic Cell-Targeting α CD40 Antibody Construct Coupled With Viral or Leukemia-Specific Antigens Enhances Dendritic Cell Maturation and Activates Peptide-Responsive T Cells. *Front Immunol.* 2020;11:602802.
166. Kreutz M, Tacke PJ, Figdor CG. Targeting dendritic cells--why bother? *Blood.* 2013;121(15):2836-44.
167. Dullforce P, Sutton DC, Heath AW. Enhancement of T cell-independent immune responses in vivo by CD40 antibodies. *Nat Med.* 1998;4(1):88-91.
168. Tacke PJ, Zeelenberg IS, Cruz LJ, van Hout-Kuijter MA, van de Glind G, Fokkink RG, et al. Targeted delivery of TLR ligands to human and mouse dendritic cells strongly enhances adjuvanticity. *Blood.* 2011;118(26):6836-44.
169. Kreutz M, Giquel B, Hu Q, Abuknesha R, Uematsu S, Akira S, et al. Antibody-antigen-adjuvant conjugates enable co-delivery of antigen and adjuvant to dendritic cells in cis but only have partial targeting specificity. *PLoS One.* 2012;7(7):e40208.
170. Morse MA, Niedzwiecki D, Marshall JL, Garrett C, Chang DZ, Aklilu M, et al. A randomized phase II study of immunization with dendritic cells modified with poxvectors encoding CEA and MUC1 compared with the same poxvectors plus GM-CSF for resected metastatic colorectal cancer. *Ann Surg.* 2013;258(6):879-86.
171. Met Ö, Jensen KM, Chamberlain CA, Donia M, Svane IM. Principles of adoptive T cell therapy in cancer. *Semin Immunopathol.* 2019;41(1):49-58.
172. Akahori Y, Wang L, Yoneyama M, Seo N, Okumura S, Miyahara Y, et al. Antitumor activity of CAR-T cells targeting the intracellular oncoprotein WT1 can be enhanced by vaccination. *Blood.* 2018;132(11):1134-45.
173. Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2012;30(36):4515-23.
174. Ochi T, Fujiwara H, Okamoto S, An J, Nagai K, Shirakata T, et al. Novel adoptive T-cell immunotherapy using a WT1-specific TCR vector encoding silencers for endogenous TCRs shows marked antileukemia reactivity and safety. *Blood.* 2011;118(6):1495-503.

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Marion Subklewe für die Idee des Projekts und die hervorragende Unterstützung bedanken.

Besonders dankbar bin ich auch Maurine Rothe, Saskia Schmitt und Christian Augsberger für die Unterstützung während meiner Laborzeit, sowohl in der Theorie als auch bei den Experimenten in der Zellkultur.

Ein großes Danke auch an Gerulf Hänel, welcher meine Arbeit Korrektur gelesen und Verbesserungen sowie viele gute Vorschläge eingebracht hat.

Der itarget Stiftung möchte ich für das Promotionsstipendium danken, wo ich in regelmäßigen Journal Clubs und weiteren Austausch andere interessante Projekte kennenlernen konnte und mich mit anderen DoktorantInnen vernetzen konnte.

Ich möchte mich bei der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Marion Subklewe für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken. Ich erinnere mich gerne an meine Zeit bei euch im Labor zurück und konnte auch einige neue Freundschaften im Labor schließen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die bedingungslose Unterstützung und die Geduld, die sie aufgebracht haben. Ohne euch hätte ich es nicht geschafft!