

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität Heidelberg

vorgelegt von

Steffen Dettling, M. Sc.

aus Bad Säckingen

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Identifizierung von Tumor-assoziierten Antigenen in IDH-mutierten Gliomen

Gutachter

Prof. Dr. Philipp Beckhove

Prof. Dr. Christel Herold-Mende

Für meine Eltern, die mir diesen Weg ermöglichten
und für Sarah, ohne die ich dieses Ziel nie erreicht hätte.

Zusammenfassung

Gliome sind Tumore des zentralen Nervensystems und werden entsprechend den Vorgaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) anhand histopathologischer und molekularbiologischer Eigenschaften in vier Gruppen (WHO^oI-IV) unterteilt. Hierbei weisen besonders niedriggradige Gliome (*Lower Grade Gliomas*, LGGs, WHO^oII-^oIII) charakteristische Mutationen im Isocitrat-Dehydrogenase (IDH^{mut}) Gen auf, welche sich als positive prognostische Marker für den klinischen Verlauf etabliert haben. Durch das wachsende Verständnis über die Auswirkungen von IDH^{mut}-bedingten epigenetischen Veränderungen auf den Metabolismus bzw. die Biologie von Gliomen, verdeutlicht sich die Notwendigkeit, IDH^{mut} LGGs im Bezug auf die Entwicklung spezifischer Therapien gesondert zu betrachten.

Obwohl IDH^{mut} LGGs im Vergleich zu Wildtyp-IDH (IDH^{wt}) Gliomen eine bessere klinische Prognose aufweisen, gelten sie durch das Fehlen effektiver Therapien als bislang unheilbare Tumorerkrankung. Immuntherapien stellen mittlerweile erfolgversprechende Behandlungsstrategien dar, welche gegenwärtig bei LGGs jedoch durch einen Mangel an geeigneten und spezifischen T-Zell-Zielstrukturen limitiert sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher das Repertoire an spontanen T-Zell-Antworten in IDH^{mut} LGGs durch proteomische Analysen untersucht werden, um neue T-Zell-Zielstrukturen zu identifizieren.

Hierfür wurden vier IDH^{mut} LGG-Tumorproteomen durch die PF2D-Methode systematisch fraktioniert und mittels IFN- γ ELISpot auf bestehende Immunantworten untersucht. Die proteomischen Bestandteile immunogener Tumorproteomfraktionen wurden anschließend mittels massenspektrometrischer Untersuchungen analysiert, was zur Identifizierung von 2.897 Proteinen führte. Durch einen umfangreichen Filterprozess wurden 79 Proteine als potentielle T-Zell-Zielstrukturen ausgewählt. Die Immunogenität der entsprechenden *in silico*-prädiktierten 50-mer Peptide wurde anschließend erneut mittels IFN- γ ELISpot bestimmt. Für 26 Antigene konnten spontane T-Zellantworten in den Ursprungspatienten nachgewiesen werden, weshalb sie unter Verwendung von peripherem Blut in einem umfangreichen Kollektiv an IDH^{mut} LGG-Patienten sowie in gesunden Probanden weiter untersucht wurden. Für die Antigene CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT konnten in bis zu 50 % der Patienten Tumor-spezifische T-Zellantworten nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden auch die onkogenen Eigenschaften, die Spezifität als auch die Expressionsstärke im Tumorgewebe und auf Stammzell-ähnlichen Gliomzellen (GSCs) untersucht. Durch immunhistochemische Färbungen und Genexpressionsanalysen konnte eine Tumor-spezifische Expression für vier der fünf immunogensten Antigene (CRKII, CFL1, CNTN1 und

NME2) auf astrozytären und oligodendroglialen Tumoren als auch auf IDH^{mut} GSCs bestätigt werden. Zuletzt konnten HLA-A*02-restringierte reaktive Epitope von CRKII (ALALEVGEL), NME2 (MVWEG-LNVV) und TKT (FLAEAELLNL) identifiziert werden, welche in IDH^{mut} LGG-Patienten von bis zu 1,5 % Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt werden.

Durch die Untersuchungen möglicher T-Zell-Zielstrukturen in IDH^{mut} LGG-Patienten konnten vier immunogene Antigene identifiziert und deren spezifische Expression IDH^{mut} LGG-Tumorgewebe und auf IDH^{mut} GSCs bestätigt werden, wodurch sie sich als potentielle Zielstrukturen für die Entwicklung von T-Zell-basierten Immuntherapien eignen.

Abstract

Gliomas are tumors of the central nervous system which are classified by the World Health Organization (WHO) from grade I to grade IV, according to the degree of malignancy as defined by histopathological and molecular criteria. Mutations in the isocitrate dehydrogenase (IDH^{mut}) genes are a common characteristic for lower grade gliomas (LGGs, WHO^o II/^o III) and have been shown to be a prognostic marker for a favorable clinical outcome. The metabolic and biologic consequences by IDH^{mut}-induced epigenetic alterations have changed our perceptions of gliomas and demonstrated the demand to consider IDH^{mut} LGGs separately. Despite a favourable prognosis, IDH^{mut} LGGs remain deadly since there is still a lack of effective therapies. For that reason, immunotherapeutic approaches are gaining increasing attention. Due to the limited number of known T cell targets in IDH^{mut} gliomas, we aimed to elucidate the repertoire of spontaneous T cell responses in IDH^{mut} LGGs by performing an unbiased proteomic approach. We systematically analyzed the proteome of IDH^{mut} LGG samples (n = 4) by fractionating tumor tissue lysates and testing resulting fractions by IFN- γ enzyme linked immunospot (ELISpot) assay for recognition by the patients T cell repertoire. Immunogenic tumor protein fractions were subsequently analyzed by quantitative mass spectrometry resulting in 2897 identified proteins. Based on a thorough filter process 79 proteins have been selected as potential target antigens and were validated in IFN- γ ELISpots by means of synthetic *in silico* predicted 50-mer peptides. 26 of these were recognized by autologous T cells and were tested in further IDH^{mut} LGG patients as well as in healthy donors. Tumor-specific T cell responses in up to 50 % of IDH^{mut} LGG patients were observed for CRKII, CFL1, CNTN1, NME2, and TKT. Beside the immunogenicity of the antigens, we further characterized their role in oncogenesis, the antigen-specificity as well as the expression levels in the tumor and on glioma stem-like cells (GSCs). By using immunohistochemistry and gene expression analysis we found that four out of five of the most immunogenic tumor-associated antigens (CRKII, CFL1, CNTN1 and NME2) were expressed in astrocytic and oligodendroglial tumors as well as in IDH^{mut} GSCs, while being almost absent in normal brain tissues. Finally, we identified HLA-A*02-restricted reactive epitopes for CRKII (ALALEVGEL), NME2 (MVWEGLNVV), and TKT (FLAEAE LLNL) which are recognized by up to 1.5 % of antigen-specific peripheral cytotoxic T cells in IDH^{mut} LGG patients.

By analyzing the repertoire of T cell target antigens in IDH^{mut} LGG patients, we identified four novel immunogenic antigens and even confirmed their expression on IDH^{mut} GSCs, highlighting their potential as T cell targets for the development of new immunotherapeutic approaches.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	III
Inhaltsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Gliome	1
1.2 Niedriggradige Gliome	2
1.2.1 Integrative Analyse genomischer und epigenetischer Veränderungen	2
1.2.2 Prognostische Relevanz der IDH-Mutationen	6
1.3 Das Immunsystem	7
1.3.1 Die humorale Immunität	7
1.3.2 Die zellvermittelte Immunität	8
1.3.3 Das Prinzip der Antigen-Präsentation	10
1.4 Die Sonderstellung des zentralen Nervensystems	11
1.4.1 Die Blut-Hirn-Schranke	12
1.4.2 Das Immunsystem der Gliome	14
1.4.3 Auswirkungen der Mikroumgebung auf das Immunsystem	17
1.4.4 Ansätze zur immuntherapeutischen Behandlung von Gliomen	19
1.5 Zielsetzungen dieser Arbeit	23
2 Material	24
2.1 Software	24
2.2 Datenbanken	24

2.3	Geräte	25
2.4	Verbrauchsmaterialien	26
2.5	Chemikalien	27
2.6	Puffer, Medien und Medienzusätze	28
2.7	Kits und Beads	31
2.8	Antikörper	31
2.9	Peptide	33
2.10	HLA-A*02 iTAg MHC-Klasse-I-Tetramere	35
2.11	Biologische Materialien	36
2.11.1	Tumorgewebe und Patientenkollektive	36
2.11.2	Validierungskollektiv gesunder Probanden	38
2.11.3	Zelllinien	38
3	Methoden	39
3.1	Zellbiologische Methoden	39
3.1.1	Zellzahlbestimmung	39
3.1.2	Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut	39
3.1.3	Isolierung und Kultivierung von dendritischen Zellen und T-Zellen	40
3.1.4	Isolierung spezifischer Zellpopulationen aus LGG-Tumorgewebe	40
3.1.5	Kultivierung von Tumorstammzellen	42
3.1.6	IFN- γ ELISpot Assay	43
3.1.7	Durchflusszytometrie	46
3.2	Biochemische Methoden	49
3.2.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	49
3.2.2	Gefriergewebeschnitte	50
3.2.3	Immunhistologie	50
3.2.4	Mikroskopieverfahren	51
3.2.5	Proteinfractionierung im zweidimensionalen Chromatographie-System	52
3.2.6	Massenspektrometrische Analyse immunogener Tumor-Proteinfractionen	55
3.3	Bioinformatische Methoden	57
3.3.1	Vorhersage von MHC-I-präsentierten T-Zell-Epitopen	57
3.4	Statistik	58
4	Ergebnisse	59
4.1	Identifizierung von potentiellen TAA-Kandidaten in IDH ^{mut} LGGs	59
4.1.1	Qualitative Beurteilung des Tumoranteils in IDH ^{mut} LGG-Geweben	59
4.1.2	Identifizierung immunogener Proteinfractionen mittels PF2D	59

4.1.3	Massenspektrometrische Untersuchung immunogener Proteinfractionen	61
4.1.4	Auswahl potentieller T-Zell-Zielstrukturen	62
4.1.5	Vorhersage von MHC-Klasse-I-Epitopen der potentiellen TAA-Kandidaten	65
4.2	Bestimmung der Immunogenität potentieller TAA-Kandidaten	66
4.2.1	Bestimmung der Immunogenität im Ursprungspatienten	66
4.2.2	Bestimmung der Immunogenität in unabhängigen IDH ^{mut} LGG-Patienten und gesunden Probanden	68
4.2.3	Identifizierung von CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT als immunogene TAAs .	71
4.2.4	Bestimmung des Zytokinspektrums TAA-spezifischer T-Zellen	71
4.3	Charakterisierung der Expressionsstärke immunogener TAAs	74
4.3.1	mRNA-Expressionsanalysen immunogener TAAs in IDH ^{mut} LGGs	74
4.3.2	Vergleich der TAA-Proteinexpression im Tumorgewebe von IDH ^{mut} LGGs und normalen Hirngeweben	75
4.3.3	Bestimmung der TAA-Proteinexpression in IDH ^{mut} Stammzell-ähnlichen Gliomzellen	78
4.3.4	Korrelation der mRNA-Expression immunogener TAAs mit dem Patientenüberleben	79
4.4	<i>In silico</i> -Vorhersage potentiell reaktiver Epitope	81
4.4.1	Vorhersage HLA-A*02:01-restringierter CFL1-Epitope	82
4.4.2	Vorhersage HLA-A*02:01-restringierter CNTN1-Epitope	83
4.4.3	Vorhersage HLA-A*02:01-restringierter CRKII-Epitope	84
4.4.4	Vorhersage HLA-A*02:01-restringierter NME2-Epitope	85
4.4.5	Vorhersage HLA-A*02:01-restringierter TKT-Epitope	86
4.5	Bestimmung der HLA-Ambiguität bei IDH ^{mut} LGG-Patienten	87
4.6	Bestimmung der Immunogenität HLA-A*02-restringierter reaktiver Epitope	88
4.6.1	Bestimmung der Immunogenität reaktiver Epitope in HLA-A*02-positiven Patienten .	89
4.6.2	Bestimmung der Immunogenität reaktiver Epitope in HLA-A*02-negativen Patienten	90
4.6.3	Vergleich von HLA-A*02-restringierten gegen nicht restringierte T-Zell-vermittelte Immunantworten	91
4.6.4	T-Zellantworten in Astrozytom- bzw. Oligodendrogliom-Patienten	92
4.6.5	<i>In silico</i> -Untersuchung der Promiskuität reaktiver Epitope innerhalb der HLA-Klasse-I-Moleküle	93
4.7	Nachweis von Antigen-spezifischen T-Zellen durch HLA-A*02 iTAg-Tetramere	96
4.7.1	Quantifizierung TAA-spezifischer zytotoxischer PBMTCs in IDH ^{mut} LGG-Patienten	97

5 Diskussion	99
5.1 Identifizierung immunogener Antigene im Proteom IDH ^{mut} LGGs mittels PF2D-IFN- γ ELISpot-Methode	102
5.1.1 Bestimmung potentieller Zielstrukturen durch systematische Reduzierung der Komplexität immunogener Tumorproteomfraktionen	103
5.1.2 <i>In silico</i> -Vorhersage von synthetischen MHC-I-Peptidsequenzen	105
5.2 Eignungsbestimmung potentieller Zielstrukturen für die Verwendung in einer LGG-spezifischen Peptid-Vakzine	107
5.2.1 Bestimmung der Immunogenität potentieller T-Zell-Zielstrukturen	107
5.2.2 Bestimmung der onkogenen Eigenschaften und Spezifität potentieller T-Zell-Zielstrukturen	109
5.3 Nachweis TAA-spezifischer zytotoxischer PBMTCs in IDH ^{mut} LGG-Patienten	118
5.3.1 Identifizierung reaktiver Epitope	118
6 Anhang	164
7 Eigene Publikationen	170
Danksagung	171

Abbildungsverzeichnis

1	Prinzip des IFN- γ ELISpot Assays	43
2	Visualisierung und Auswertung der IFN- γ Spots Assays mittels CTL-Analyzer	46
3	Prinzip des Zytokin-Sekretions-Assays	48
4	Identifizierung potentieller TAA-Kandidaten mittels PF2D und IFN- γ ELISpot Assay	52
5	Repräsentative Darstellung der PF2D und ELISpot-Analyse von Patient NCH1150	60
6	Grafische Darstellung der Anzahl Patienten-spezifisch identifizierter Proteine, sowie der Schnittmenge zwischen den Patienten	62
7	<i>In silico</i> -Vorhersage von langen Peptiden der potentiellen TAA-Kandidaten	65
8	Bestimmung der Immunogenität potentieller TAA-Kandidaten in den Ursprungspatienten	67
9	Bestimmung der Immunogenität potentieller TAA-Kandidaten in IDH ^{mut} LGG-Patienten und gesunden Probanden	69
10	Bestimmung des Zytokinspektrums Antigen-spezifischer T-Zellen nach Stimulierung	72
11	Systematische Durchführung einer Mehrfarben-Durchflusszytometrie zur Phänotypisierung Zytokin-sekretierender T-Zellen	73
12	Array-basierte Genexpressionsanalysen in IDH ^{mut} LGG-Tumoren	74
13	Immunhistochemische Untersuchung der Expression von CFL1, CRKII, NME2, CNTN1 und TKT in normalem Hirngewebe sowie in IDH ^{mut} LGG-Tumorgeweben	76
14	Semiquantitative Beurteilung der Proteinexpression von Antigene in IDH ^{mut} Astrozytomen und Oligodendrogliomen (WHO ^o II/ ^o III)	77
15	Grafische Darstellung der Expression von CFL1, CRKII, NME2, CNTN1 und TKT auf IDH ^{mut} GSCs	78
16	Grafische Darstellung der Zusammenhänge zwischen der TAA-Genexpression und dem Überleben der IDH ^{mut} LGG-Patienten	80
17	Vorhersage HLA-A*02:01-restringierter CFL1-Peptide	82
18	Vorhersage HLA-A*11:01-/B*07:02-restringierter CNTN1-Peptide.	83
19	Vorhersage HLA-A*02:01-restringierter CRKII-Peptide.	84
20	Vorhersage HLA-A*02:01-restringierter NME2-Peptide	85
21	Vorhersage HLA-A*02:01-restringierter TKT-Peptide.	86

22	Grafische Darstellung der HLA-Ambiguitäten der IDH ^{mut} LGG-Patienten	88
23	Validierung der potentiell reaktiven Epitope durch IFN- γ ELISpot Assays	88
24	Zusammenfassung der Immunogenitätsvalidierung der potentiell reaktiven Epitope in IDH ^{mut} HLA-A*02-positiven LGG-Patienten.	89
25	Zusammenfassung der Immunogenitätsvalidierung der potentiell reaktiven Epitope in IDH ^{mut} HLA-A*02-negativen LGG-Patienten.	90
26	Zusammenfassung der Immunogenitätsvalidierung der potentiell reaktiven Epitope in IDH ^{mut} HLA-A*02-positiven und -negativen LGG-Patienten.	91
27	Immunogenitätsvalidierung der potentiell reaktiven Epitope in den LGG-Subentitäten Astro- zytom und Oligodendrogliom.	92
28	Detaillierte Betrachtung signifikant erhöhter T-Zellantworten der IDH ^{mut} LGG-Patienten gegen die potentiell reaktiven Epitope.	93
29	<i>In silico</i> -Untersuchung der Promiskuität reaktiver Epitope innerhalb HLA-Klasse-I-Moleküle	94
30	Schematische Darstellung der Quantifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen in IDH ^{mut} LGG-Patienten mittels iTAg HLA-Klasse-I-Tetrameren.	96
31	Auswertung der quantitativen Analyse von Antigen-spezifischen T-Zellen mittels iTAg HLA- A*02-Tetrameren.	98
32	Modularer Aufbau der funktionell unterschiedlichen CRK-Adaptorproteine.	110
33	Nachweis spontaner T-Zell-vermittelter Immunantworten mittels IFN- γ ELISpots der Pati- enten NCH1390, NCH612 und NCH519a	164
34	Zellkompartiment-spezifische Zuordnung der massenspektrometrisch identifizierten Pro- teine	165

Tabellenverzeichnis

1	WHO-Klassifizierung von niedriggradigen Gliomen des zentralen Nervensystems	3
2	Auflistung der verwendeten Software	24
3	Auflistung der verwendeten Datenbanken	24
4	Auflistung der verwendeten Geräte	25
5	Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien	26
6	Auflistung der verwendeten Chemikalien	27
7	Auflistung von Medien, Puffern und Zusätzen	28
8	Zusammensetzung von Medien und Puffern für die Zellkultur	29
9	Zusammensetzung von Puffern und Lösungen	30
10	Auflistung der verwendeten Kits und Beads	31
11	Auflistung der verwendeten Primärantikörper	31
12	Auflistung der verwendeten Isotypkontrollen	31
13	Auflistung der verwendeten PE-konjugierten Sekundärantikörper	32
14	Auflistung der verwendeten Antikörper für den IFN- γ ELISpot Assay	32
15	Auflistung der verwendeten FACS-Antikörper für den Zytokin-Sekretions-Assay, sowie dem Nachweis von phänotypischen und funktionellen Veränderungen in T-Zellen	32
16	Auflistung der synthetisch hergestellten langen Peptide	33
17	Auswahl von HLA A*02:01-restringierten reaktiven Epitopen.	35
18	Auflistung der verwendeten HLA-A*02 iTag MHC-Klasse-I-Tetramere	35
19	Patientenkollektiv zur Identifizierung von Zielstrukturen T-Zell-vermittelter Immunantworten in Patienten mit IDH ^{mut} LGGs	36
20	Validierungskollektiv zum Nachweis T-Zell-vermittelter Immunantworten durch die Auswahl potentieller TAA-Kandidaten in IDH ^{mut} LGG-Patienten	37
21	Validierungskollektiv zum Nachweis T-Zell-vermittelter Immunantworten durch reaktive Epitope in IDH ^{mut} LGG-Patienten	37
22	Validierungskollektiv zum Nachweis von Tumor-unabhängigen T-Zell-vermittelten Immunantworten durch reaktive Epitope in gesunden Probanden	38
23	Auflistung der verwendeten und authentifizierten IDH ^{mut} Gliom-Zelllinien	38

24	Häufigkeitsverteilung von HLA-Typen in der deutschen Bevölkerung	57
25	Patienten-spezifische Auflistung der immunogenen Tumor-Proteinfraktionen sowie der identifizierten Proteine	61
26	Auflistung der ausgewählten Proteine für weitere Analysen	63
27	Durchflusszytometrische Validierung der Expression von CFL1, CRKII, NME2, CNTN1 und TKT auf IDH ^{mut} GSC-Zelllinien	79
28	Tabellarische Auflistung der Assoziation von mRNA-Genexpression der TAAs und dem Gesamtüberleben der IDH ^{mut} LGG-Patienten	81
29	Auswahl HLA-A*02:01-restringierter CFL1-Peptide.	82
30	Auswahl HLA-A*11:01-/B*07:02-restringierter CNTN1-Peptide	83
31	Auswahl HLA-A*02:01-restringierter CRKII-Peptide	84
32	Auswahl HLA-A*02:01-restringierter NME2-Peptide	85
33	Auswahl HLA-A*02:01-restringierter TKT-Peptide	86
34	Bestimmung der HLA-A- und HLA-B-Ambiguität bei IDH ^{mut} LGG-Patienten	87
35	Funktionelle Annotation der identifizierten potentiellen TAA-Kandidaten	166
36	GOTERM-Analyse der identifizierten potentiellen TAA-Kandidaten	167
37	HLA-A/B-Allele-Alternativen der <i>in silico</i> -Bestimmten HLA-A*02-restringierten Epitope . .	168
38	Quantifizierung Antigen-spezifischer zytotoxischer PBMTCs	169

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AdV	Adenovirus
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AF488	Alexa Fluor 488
AF700	Alexa Fluor 700
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen-presenting cell</i>)
APC-Cy7	Allophycocyanin - Cyanin 7
AS	Aminosäure
AU	Absorptionseinheiten (<i>absorbance units</i>)
BBB	Blut-Hirn-Schranke (<i>blood-brain barrier</i>)
BCA	Bicinchoninsäure
BCR	B-Zell-Rezeptor (<i>B cell receptor</i>)
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BV	Brilliant Violet
bzw.	beziehungsweise
CAR	<i>chimeric antigen receptor</i>
CF	Chromatofokussierung
CMV	Cytomegalovirus
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazelluläre Matrix (<i>extracellular matrix</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
ELISpot	<i>enzyme-linked immunospot assay</i>
F	Fraktion
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FKS	fötale Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
g	Gramm

Abkürzung	Bedeutung
GAM	Gliom-assoziierte Mikrogliazellen
GBM	Glioblastom
GP	gesunde Probanden
GSC	Stammzell-ähnliche Gliomzelle (<i>glioma stem-like cell</i>)
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration (<i>half maximal inhibitory concentration</i>)
IDH ^{mut}	Isocitrat-Dehydrogenase (mutiert)
IDH ^{wt}	Isocitrat-Dehydrogenase (wildtyp)
IEDB	<i>Immune Epitope Database and Analysis Resource</i>
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
iT _{reg}	induzierbare regulatorische T-Zellen
JPEG	<i>Joint Photographic Experts Group</i>
kDA	Kilodalton
LC-ESI-MS/MS	<i>liquid-chromatography-electrospray-ionisation-tandem mass spectrometry</i>
LGG	niedriggradige Gliome (<i>lower grade gliomas</i>)
LOH	<i>loss of heterogeneity</i>
m	männlich
mAB	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
n	Anzahl
n.a.	nicht verfügbar (<i>not available</i>)
n.s.	nicht signifikant (<i>not significant</i>)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	Negativkontrolle
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nM	Nanomolar
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBMTC	mononukleäre T-Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear T cells</i>)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline</i> + Tween 20
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin - Cyanin 7
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PerCP-Cy5.5	Peridinin Chlorophyll - Cyan 5.5
PerCP-EF710	Peridinin Chlorophyll - eFluor 710
PF2D	<i>two-dimensional protein fractionation system</i>
PFA	Paraformaldehyd
pGBM	primäres Glioblastom
pH	(lateinisch) <i>potentia hydrogenii</i>

Abkürzung	Bedeutung
pl / IEP	isoelektrischer Punkt
PK	Positivkontrolle
ppm	<i>parts per million</i>
RE	reaktives Epitop
rGBM	rezidiertes Glioblastom
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPC	Umkehrphasenchromatographie (<i>reversed-phase chromatography</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
sGBM	sekundäres Glioblastom
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>sideward scatter</i>)
STR	<i>short tandem repeats</i>
T _{CM}	zentrale Gedächtnis T-Zellen
T _{EM}	Effektor-Gedächtnis T-Zellen
T _{EFF}	Effektor T-Zellen
T _N	naive T-Zellen
T _{REG}	regulatorische T-Zellen
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TC	T-Zellen (<i>T cells</i>)
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TFA	Trifluoressigsäure
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten (<i>tumor infiltrating lymphocytes</i>)
TSA	Tumor-spezifische Antigene
TSZ	Tumorstammzellen
UV	ultraviolett
w	weiblich
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
xg	x-fache Erdbeschleunigung
ZNS	zentrales Nervensystem
°C	Grad Celsius
1D	erste Dimension
2D	zweite Dimension
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
mL	Milliliter
mm	Millimeter
α	alpha
β	beta
γ	gamma
%	Prozent

1 Einleitung

1.1 Gliome

Gliome sind primäre Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS) mit einem neuroepithelialen Ursprung und werden entsprechend den Vorgaben der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) anhand histopathologischer und molekularbiologischer Eigenschaften in vier Gruppen (WHO^oI-IV) unterteilt (Louis *et al.*, 2007, 2016). Obwohl die genaue Entstehung von Gliomen noch nicht abschließend geklärt ist, geht man davon aus, dass sie ihren Ursprung unter anderem in neuralen Stammzellen haben (Canoll und Goldman, 2008; Dirks, 2010; Liu *et al.*, 2011). Auch der Grund für die Entstehung von Gliomen bleibt im Wesentlichen unbekannt. Lediglich eine erhöhte Strahlungsbelastung wird als möglicher Risikofaktor beschrieben (Prasad und Haas-Kogan, 2009). Im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen treten Gliome mit einer Inzidenzrate von 28,57 pro 100,000 Menschen jedoch eher selten auf (Ostrom *et al.*, 2015). Laut einer statistischen Erhebung in den USA sind Gliome (27 %), nach den überwiegend benignen Meningeomen (45 %), die zweithäufigste Tumorerkrankung im ZNS. Durch ihren besonders aggressiven und tödlichen Verlauf stellen sie jedoch die häufigste Form (80 %) maligner Hirntumore dar. Prognosen zum klinischen Verlauf einer Gliomerkrankung basieren auf der WHO-Klassifizierung, welche die Dignität der Tumore widerspiegelt (Louis *et al.*, 2016). Die Klassifizierung erfolgte jeher aufgrund histopathologischer Merkmale und umfasst Zellen in der Teilungsphase (Mitose), Kernatypien, die mikrovaskuläre Proliferation (Gefäßneubildung) und die Erkennung von nekrotischen Bereichen, welche Anzeichen für die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore sind (Perry und Wesseling, 2016). Als Ergänzung zur pathologischen Diagnose hat die Bestimmung von molekularbiologischen Tumormarkern in den vergangenen Jahren jedoch deutlich an Bedeutung gewonnen (siehe Kapitel 1.2) (Brat *et al.*, 2015).

WHO^oI Tumore, wie das pilozytische Astrozytom, gelten als benigne, da sie ein nur sehr langsames Zellwachstum aufweisen und gut abgegrenzt wachsen. Das pilozytische Astrozytom ist das häufigste Gliom bei Kindern (Ostrom *et al.*, 2015) mit einem durchschnittlichen Diagnosealter von $19,6 \pm 12,7$ Jahren (Burkhard *et al.*, 2003) und gilt bei entsprechender Behandlung zu 90 % als heilbar (Collins *et al.*, 2015).

WHO^oII Gliome, wie das diffuse Astrozytom oder das Oligodendrogliom, wachsen ebenfalls nur sehr langsam, jedoch kontinuierlich (Stupp *et al.*, 2013). Sie sind durch eine niedrige Zelldichte charakterisiert

und zeigen in aller Regel noch keine Anzeichen von Mitose, Nekrose und Gefäßproliferation (Perry und Wesseling, 2016; Pouratian und Schiff, 2010).

WHO[°]III Gliome, wie das anaplastische Astrozytome und das anaplastische Oligodendrogliome zeigen vermehrt histopathologische Merkmale, die für ein schnelleres Tumorwachstum sprechen (Perry und Wesseling, 2016). Im Vergleich zu WHO[°]II Tumoren zeigen sie neben dem infiltrativen Wachstum bereits deutliche Anzeichen für eine erhöhte Zellularität, Zellatypien sowie eine gesteigerte Mitose- und Proliferationsaktivität.

WHO[°]IV Gliome werden als Glioblastome (GBMs) bezeichnet, wobei es sich hierbei um die häufigste (Ostrom *et al.*, 2015) und aggressivste Form der primären Gliome handelt (Louis *et al.*, 2007). Das durchschnittliche Diagnosealter beträgt 59,6 Jahre und tritt 1,6-mal häufiger bei Männern als bei Frauen auf. GBMs sind heterogene Neoplasien, bestehend aus differenzierten Zellen mit einer hohen Proliferationsrate, bei denen außerdem ein hohes Maß an Gefäßneubildungen und nekrotischen Bereichen erkennbar ist (Miller und Perry, 2007; Perry und Wesseling, 2016). Im Weiteren werden GBMs aufgrund ihrer Pathogenese sowie einer distinkten Tumorbilologie in „*de novo*“ auftretende primäre Glioblastome (pGBMs) und sekundäre Glioblastome (sGBMs) unterteilt, die sich aus Progression eines zuvor vorhandenen niedriggradigen Glioms entwickeln (Ohgaki und Kleihues, 2013). Besonders auffallend ist hierbei die unterschiedliche Altersverteilung sowie der Verlauf der Tumorerkrankung, da sGBMs häufig bei jüngeren Patienten auftreten und eine deutlich bessere Prognose aufweisen (Toedt *et al.*, 2011).

1.2 Niedriggradige Gliome

Um Probleme bei der Definition sowie der stilistischen Übersetzbarkeit von der englischen in die deutsche Sprache zu vermeiden wurde, in Anlehnung an die 2016 veröffentlichte wegweisende Publikation der TCGA, der Begriff „*Lower Grade Gliomas*“ (LGGs) im Verlauf dieser Arbeit als niedriggradige Gliome übersetzt (Brat *et al.*, 2015). Das Hypernym „niedriggradige Gliome“ umfasst daher WHO[°]II und [°]III Gliome, welche basierend auf der aktuellen WHO-Klassifizierung von Tumoren des ZNS (Tabelle 1) kategorisiert sind (Brat *et al.*, 2015; Louis *et al.*, 2016). Niedriggradige Gliome haben im Vergleich zu GBMs (3,2 pro 100,000 Menschen) eine deutlich geringere Inzidenz (1,5 pro 100,000 Menschen) und treten am häufigsten bei Patienten im Alter zwischen 35-44 Jahren auf (Ostrom *et al.*, 2015).

1.2.1 Integrative Analyse genomischer und epigenetischer Veränderungen

Die traditionelle histopathologische Beurteilung bildet bis heute die Grundlage zur Klassifizierung von ZNS-Tumoren sowie deren therapeutischen Behandlungsansätzen (Louis *et al.*, 2007, 2016). Aufgrund der heterogenen Morphologie von Gliomen war die Einteilung in die beschriebenen WHO-Grade zwar eine rasche Entscheidungshilfe für die behandelnden Ärzte, erwies sich jedoch in vielen Fällen als nicht

Tabelle 1: WHO-Klassifizierung von niedriggradigen Gliomen des zentralen Nervensystems (2016 CNS WHO) ergänzt durch molekularbiologische Marker (Brat *et al.*, 2015; Louis *et al.*, 2016)

WHO ^o	Diagnose	IDH-Status	1p/19q LOH	spezifische Mutationen
II	Diffuses Astrozytom	IDH ^{mut}	negativ	<i>TP53, ATRX</i>
II	Diffuses Astrozytom	IDH ^{wt}	negativ	-
II	Diffuses Astrozytom, NOS	n.a.	n.a.	n.a.
III	Anaplastisches Astrozytom	IDH ^{mut}	negativ	<i>TP53, ATRX</i>
III	Anaplastisches Astrozytom	IDH ^{wt}	negativ	-
III	Anaplastisches Astrozytom, NOS	n.a.	n.a.	n.a.
II	Oligodendrogliom	IDH ^{mut}	positiv	<i>TERT, CIC, FUBP1, NOTCH1</i>
II	Oligodendrogliom, NOS	n.a.	n.a.	n.a.
III	Anaplastisches Oligodendrogliom	IDH ^{mut}	positiv	<i>TERT, CIC, FUBP1, NOTCH1</i>
III	Anaplastisches Oligodendrogliom, NOS	n.a.	n.a.	n.a.

Abkürzungen: mut, mutiert; wt, wildtyp; n.a., nicht verfügbar; NOS, nicht weiter spezifiziert

prädiaktiv genug (Louis *et al.*, 2016). Weitere prognostische Faktoren, die den Verlauf einer Tumorerkrankung beeinflussen bzw. bei der Wahl einer adjuvanten Radio- bzw. Chemotherapie im Therapiekonzept eine Rolle spielen, sind neben dem Alter der Patienten und der Tumorlokalisierung auch das Resektionsausmaß, der Karnofsky-Index und die Kontrastmittelanreicherung in bildgebenden Untersuchungsverfahren (Schiff *et al.*, 2007; Tait *et al.*, 2009).

Die Durchführung moderner Hochdurchsatzanalysen zur Untersuchung von Genom, Epigenom und Transkriptomvariationen in Gliomen führte in den vergangenen zwei Jahrzehnten zu einer Erweiterung des genetischen Wissens um Tumorgenese und Tumorwachstum und erst kürzlich zur Revision des traditionellen WHO-Klassifizierungssystems (Louis *et al.*, 2016). Einem internationalen Konsortium gelang es u.a. mittels mRNA-Expressionsanalysen, DNA-Kopienanalysen bzw. Methylierungsanalysen, Transkriptomanalysen und weiterer Methoden, an einem umfangreichen LGG-Patientenkollektiv neue molekularbiologische Merkmale zu definieren, die besser mit der Prognose von LGGs korrelieren (Brat *et al.*, 2015). Diese Erkenntnisse werden in der revidierten WHO-Klassifizierung dazu genutzt, LGGs von nun an durch die Kombination aus histopathologischen und genetischen Merkmalen, wie der Punktmutation (*mutation*, mut) im Isocitrat-Dehydrogenase (IDH) Gen und dem kombinierten Verlust der Allele (*loss of heterozygosity*, LOH) auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 (1p) und dem langen Arm von Chromosom 19 (19p), zu klassifizieren (siehe Tabelle 1) (Louis *et al.*, 2016). Gliome, bei denen keine molekularbiologische Analyse durchgeführt werden konnte, werden als nicht weiter spezifizierte (*not otherwise specified*, NOS) Astrozytome bzw. Oligodendrogliome basierend auf histopathologischen Merkmalen klassifiziert.

Auf die histologische Beurteilung der WHO-Grade kann zu diesem Zeitpunkt aufgrund kontroverser Be-

obachtungen (Killela *et al.*, 2014) noch nicht verzichtet werden, auch wenn die auf der IDH-Mutation basierten Klassifizierung in beiden WHO-Graden eine bessere Prognose ermöglicht (Brat *et al.*, 2015; Wesseling *et al.*, 2015). Der Vorteil der integrativen WHO-Klassifizierung liegt in der molekularbiologischen Eliminierung beobachterabhängiger Urteilsverzerrungen wie die jeher umstrittene Diagnose der Oligoastrozytome (Giannini *et al.*, 2008; Killela *et al.*, 2014; Reuss *et al.*, 2014; Chan *et al.*, 2015; Brat *et al.*, 2015; Wesseling *et al.*, 2015) und resultiert im Wesentlichen in die im Folgenden beschriebenen Subklassen astrozytärer und oligodendroglialer Gliome.

IDH-mutierte Astrozytome Die Bezeichnung Astrozytom wurde gegen Ende des 19. Jahrhunderts von Rudolf Virchow (Virchow, 1858) eingeführt und ist seit 1926 ein feststehender Begriff in der Histopathologie (Bailey und Cushing, 1928). Astrozytome sind histomorphologisch durch einen hohen Anteil astrozytärer Zellen definiert und bilden die häufigste Form von Gliomen (17,2 %) (Ostrom *et al.*, 2015). Astrozytome lassen sich histologisch in vier Hauptgruppen einteilen (Kleihues und Louis, 2002). Die in der weißen Substanz vorkommenden, fibrillären Astrozytome sind dabei die am häufigst auftretende Form. Protoplastische Astrozytome kommen vielfach in der grauen Substanz vor und sind durch Kernatypien wie z.B. Anisonukleose und ein verkleinertes Zytoplasma charakterisiert. Gemistozytische Astrozytome zeigen einen hohen Anteil an Fibrillen und eine starke Vermehrung des Zytoplasmas. Basierend auf der astrozytären Histopathologie werden alle IDH-mutierten Tumore ohne 1p/19q Ko-Deletion als diffuse Astrozytome (WHO^oII, IDH^{mut}) oder anaplastische Astrozytome (WHO^oIII, IDH^{mut}) zusammengefasst (Tabelle 1) (Brat *et al.*, 2015). Die IDH-mutierten Astrozytome weisen zudem häufig den Verlust bzw. die Inaktivierung der *ATP-Dependent Helicase (ATRX)*, 86 % sowie einer spezifischen Punktmutation im *tumor suppressor gene p53 (TP53)*, 94 % auf, die allerdings nicht zwangsläufig Voraussetzung für die Diagnose sind (Brat *et al.*, 2015). Symptome können je nach Lokalisation des Tumors von epileptischen Anfällen, Kopfschmerzen, Schwindel bis hin zu psychischen Störungen und neurologischen Defiziten reichen und treten erst lange Zeit nach Entstehung der Neoplasie auf (Pouratian und Schiff, 2010). Durch das infiltrative Wachstum von diffusen und anaplastischen Astrozytomen ist eine totale Resektion des Tumors sehr schwierig, wodurch sie häufig zur Rezidivierung mit gleichbleibender bzw. ansteigender Malignität neigen (Brat *et al.*, 2015). Retrospektive Auswertungen weisen daher auf die Relevanz eines maximalen Resektionsausmaßes hin (Hardesty und Sanai, 2012). Besonders bei IDH^{mut} WHO^oII Astrozytomen stellt ein umfangreiches Resektionsausmaß (>40 %) einen prognostischen Marker für das progressionsfreie Überleben ($p = 0,031$) sowie das Gesamtüberleben ($p = 0,01$) dar (Jungk *et al.*, 2016). Astrozytome werden am häufigsten bei Patienten mit einem medianen Alter von 38,1 Jahren diagnostiziert (Brat *et al.*, 2015). Abhängig vom WHO-Grad der Astrozytome (IDH^{mut}; ohne 1p/19q Ko-Deletion) beträgt das durchschnittliche Überleben der Patienten 8,1 Jahre (WHO^oII) oder 5,6 Jahre (WHO^oIII) (Brat *et al.*, 2015).

IDH-wildtyp Astrozytome Astrozytome, die basierend auf histopathologischen Merkmalen klassifiziert wurden, jedoch genetisch keine IDH-Mutation aufweisen (IDH^{wt}, ohne 1p/19q Ko-Deletion), werden in der aktuellen WHO-Klassifizierung als diffuse Astrozytome IDH^{wt} (WHO^oII) oder anaplastische Astrozytome IDH^{wt} (WHO^oIII) bezeichnet (Louis *et al.*, 2016). Neuste Erkenntnisse haben jedoch gezeigt, dass es sich bei ca. 80 % der diagnostizierten Astrozytome IDH^{wt} tatsächlich um falsch diagnostizierte GBMs oder pilozytische Astrozytome (WHO^oI) zu handeln scheint und sie daher sorgfältig charakterisiert werden müssen (Reuss *et al.*, 2015). Aufgrund des molekularen Profils und des klinischen Verlaufs weisen IDH^{wt} Astrozytome häufig eine große Ähnlichkeit zu den IDH^{wt} GBMs auf (Reuss *et al.*, 2015; Brat *et al.*, 2015). Dies zeigt sich auch durch die schlechteste Überlebenszeit im Vergleich zu IDH^{mut} Astrozytomen bzw. Oligodendrogliomen (Brat *et al.*, 2015).

IDH-mutierte, 1p/19q ko-deletierte Oligodendrogliome Oligodendrogliome lassen sich mikroskopisch durch eine moderate Hyperzellularität mit isomorphen Tumorzellen erkennen (Hartmann und von Deimling, 2009). Des Weiteren zeigen die Zellen eine WHO-Grad-abhängige, proliferative Aktivität und weisen besonders im Bereich der Infiltrationszone Kalkablagerungen auf (Louis *et al.*, 2007; Hartmann und von Deimling, 2009). Tumore mit einer IDH-Mutation und einer Ko-Deletion der Chromosomenarme 1p/19q (IDH^{mut}; 1p/19q ko-deletiert) können eindeutig als Oligodendrogliome (WHO^oII) bzw. anaplastische Oligodendrogliome (WHO^oIII) diagnostiziert werden (Brat *et al.*, 2015). Mutationen in den Genen der *Telomerase Reverse Transcriptase (TERT, 96 %)*, *Capicua Transcriptional Repressor (CIC, 62 %)*, *NOTCH1 (31 %)* und *Far Upstream Element Binding Protein 1 (FUBP1, 29 %)* sind zusätzlich mit Oligodendrogliomen assoziiert (Eckel-Passow *et al.*, 2015; Brat *et al.*, 2015). Oligodendrogliome machen nur einen Anteil von 1,6 % aller ZNS-Tumore bzw. nur 5,7 % aller primären Gliome aus (Ostrom *et al.*, 2015). Sie treten häufig im Frontallappen auf, können jedoch in der gesamten zerebralen Hemisphäre entstehen. Besonders durch das sehr langsame Wachstum werden Oligodendrogliome häufig erst Jahre nach ihrer Entstehung diagnostiziert. Das mediane Alter der Patienten bei Diagnose beträgt 45,4 Jahre (Brat *et al.*, 2015). Übliche Symptome umfassen Kopfschmerzen, epileptische Anfälle und Persönlichkeitsveränderungen, die je nach Größe und Lokalisation der Neoplasie variieren können (Hartmann und von Deimling, 2009). Die Prognose für die nur langsam wachsenden Oligodendrogliome (IDH^{mut}; 1p/19q ko-deletiert) ist verhältnismäßig gut (Ostrom *et al.*, 2015). Das durchschnittliche Überleben der Patienten beträgt in Abhängigkeit des WHO-Grades 12,2 Jahre (WHO^oII) bzw. 6,3 Jahre (WHO^oIII) (Brat *et al.*, 2015).

Nicht weiter spezifizierte niedriggradige Gliome Falls keine umfangreiche Bestimmung der IDH-Mutation sowie anderer genetischer Merkmale durchgeführt werden kann, werden sowohl diffuse als auch anaplastische Astrozytome durch den Zusatz (*not otherwise specified, NOS*) als nicht weiter spezifiziert gekennzeichnet (Louis *et al.*, 2016). Auch werden Oligodendrogliome beider WHO-Grade, bei

denen keine molekularbiologische Untersuchung durchgeführt wurde, als nicht weiter spezifizierte Oligodendrogliome (NOS) bzw. anaplastische Oligodendrogliome (NOS) klassifiziert.

1.2.2 Prognostische Relevanz der IDH-Mutationen

Mutationen in den IDH-Genen wurden erstmals bei Mutationsanalysen in GBMs nachgewiesen (Parsons *et al.*, 2008) und haben sich bei genaueren Untersuchungen als zuverlässige Marker für LGGs herausgestellt (Brat *et al.*, 2015). Man beobachtet konservierte Punktmutationen im *IDH1*- und/oder *IDH2*-Gen, wobei die *IDH1*-Mutation, welche durch eine Aminosäuren-Substitution von Arginin (R) zu Histidin (H) (R132H) resultiert, die häufigst auftretendste Form ist (91 %) (Watanabe *et al.*, 2009). *IDH1*-Mutationen finden sich mit einer hohen Inzidenz in den histologischen Phänotypen Astrozytom (68 %), Oligodendrogliom (69 %) und den sGBMs (88 %), wobei sie nur in 12 % der pGBMs nachgewiesen werden (Hartmann *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2009).

Die oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat (α -KG), welches die normale katalytische Funktion der IDH-Enzyme darstellt, wird durch die heterozygot-mutierten IDH-Varianten signifikant verringert (Prensner und Chinnaiyan, 2011; Duncan *et al.*, 2012). Durch eine mutationsbedingte Strukturänderung des aktiven Zentrums katalysiert sowohl IDH1 als auch IDH2 unter Verbrauch von Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADPH) die Reduzierung von α -KG in den Onko-Metaboliten 2-Hydroxyglutarat (2-HG) (Dang *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2010). Durch die Akkumulation von 2-HG im Zytoplasma wird die katalytische Funktion von α -KG-abhängigen Enzymen im Nukleus wie u.a. *Tet Methylcytosine Dioxygenase 2* (TET2) und den Histon-Demethylasen aus der *Lysine (K)-Specific Demethylase* (KDM) Familie inhibiert, wodurch keine Demethylierung von DNA bzw. Histonen stattfindet (Yen *et al.*, 2010; Prensner und Chinnaiyan, 2011).

Die daraus resultierende Hypermethylierung der DNA führt zu sogenannten epigenetischen Veränderungen, die einen Einfluss auf die Genexpression haben, ohne dabei jedoch die genetische Zusammensetzung der DNA-Sequenz zu verändern (Jones und Baylin, 2007). Da die DNA-Methylierung nur an Cytosin-Basen stattfinden kann, sind besonders Bereiche mit einer hohen Dichte an Cytosin und Guanin (CpG)-Dinukleotiden, den sogenannten CpG-Inseln betroffen (Laird, 2003). Die CpG-Hypermethylierung in der Promotorregion führt generell zur Stilllegung der Transkription nachfolgender Gene, was durch eine inverse Korrelation der Methylierung und der Transkription gezeigt werden konnte (Eckhardt *et al.*, 2006). Als „genomische Instabilitäten“ gehören epigenetische Veränderungen wie beispielsweise die DNA-Methylierungen und Histon-Modifikationen mittlerweile zu den typischen Merkmalen von malignen Neoplasien, den sogenannten „*Hallmarks of Cancer*“, wie durch Douglas Hanahan und Robert A. Weinberg beschrieben (Hanahan und Weinberg, 2011).

In Gliomen führen diese CpG-Hypermethylierungen zur Ausbildung eines sogenannten *glioma CpG island methylator phenotype* (G-CIMP), welcher eine charakteristische Eigenschaft von IDH-mutierten

Gliomen und ein prognostischer Marker für eine weniger aggressive Tumorbilologie bzw. einen besseren klinischen Verlauf ist (Noushmehr *et al.*, 2010; Turcan *et al.*, 2012; Brat *et al.*, 2015).

1.3 Das Immunsystem

Der Begriff Immunsystem umfasst die vorhandenen biologischen Abwehrmechanismen des menschlichen Körpers und lässt sich in die unspezifische (angeborene) und spezifische (adaptive) Immunabwehr unterteilen.

Die unspezifische bzw. angeborene Immunabwehr dient als erster Abwehrmechanismus auf eine akute Infektion, da sie nicht erregerspezifisch agiert und auch kein immunologisches Gedächtnis entwickelt (Murphy *et al.*, 2012). Dazu gehören in der ersten Verteidigungslinie die Haut (Elias, 2007) und die Schleimhäute (McGhee *et al.*, 1992; Turner, 2009), die eine physikalische und chemische Schutzbarriere bilden. Die zweite Verteidigungslinie wird von phagozytischen weißen Blutzellen wie Neutrophilen, Makrophagen, dendritischen Zellen sowie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gebildet (Murphy *et al.*, 2012). Erreger, die die Epithelbarriere überwinden, werden von im Blut zirkulierenden dendritischen Zellen oder gewebsständigen Makrophagen anhand von Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*) gezielt erkannt und phagozytiert (Gordon, 2002). Durch die zusätzliche Sekretion von Botenstoffen wie beispielsweise Chemokinen, Interferonen oder Bestandteilen des Komplementsystems werden Pathogen-unspezifische Entzündungsreaktionen (z.B. Fieber) unterstützt (Murphy *et al.*, 2012). Aktivierte dendritische Zellen bewegen sich in die umliegenden Lymphknoten, wo sie zelluläre Bestandteile der adaptiven Immunantwort stimulieren, bzw. spezifische Abwehrmechanismen aktivieren. Diese zeichnen sich besonders durch effiziente Immunreaktionen aus, mit der sie Antigene, wie z.B. Pathogene, allogene Zellen, aber auch entartete autologe Zellen (z.B. Krebszellen) erkennen und eliminieren (Novotný *et al.*, 1983; Garcia *et al.*, 1999).

Die spezifischen Abwehrmechanismen des menschlichen Körpers bestehen hauptsächlich aus Lymphozyten und Antikörpern, die durch klonale Selektion ein hohes Maß an Spezifität erwerben und somit zu einem immunologischen Gedächtnis beitragen (Davis und Bjorkman, 1988; Murphy *et al.*, 2012; Shulman *et al.*, 2014).

Lymphozyten können primär in B-Lymphozyten (B-Zellen) und T-Lymphozyten (T-Zellen) unterteilt werden (Murphy *et al.*, 2012). Während B-Zellen für die humorale Immunität verantwortlich sind, besteht die Hauptaufgabe von T-Zellen in der Ausübung einer zellvermittelten Immunität (Murphy *et al.*, 2012).

1.3.1 Die humorale Immunität

B-Zellen erkennen spezifische Antigene, beispielsweise von Toxinen, Bakterien oder Viren, in den Körperflüssigkeiten mittels membrangebundener Antikörper (Oberflächen-Immunglobuline), dem so-

nannten B-Zell-Rezeptor (*B cell receptor*, BCR) (Murphy *et al.*, 2012). B-Zellen, die ein Antigen mit hoher Affinität binden, können im Weiteren zu Plasmazellen differenzieren und dienen der Produktion und Sekretion von Antikörpern (Pieper *et al.*, 2013). Antikörper sind Proteinstrukturen, die jeweils aus zwei identischen leichten und schweren Ketten bestehen (Murphy *et al.*, 2012). Durch die variablen Regionen des Antikörpers erkennen und binden sie Antigene und bilden somit einen spezifischen Antigen-Antikörper-Komplex (Sheriff *et al.*, 1987). Man unterscheidet zwischen den Effektormechanismen der Neutralisation, der Opsonierung, der Agglutination, der Präzipitation sowie der Komplementfixierung (Murphy *et al.*, 2012). Durch die Aktivierung des Komplementsystems verbinden sich verschiedene Komplementfaktoren und bilden einen lytischen Komplex, welcher zur direkten Lyse der Plasmamembran fremder bzw. infizierter Zellen führt (Weiner, 2015).

1.3.2 Die zellvermittelte Immunität

Bei der zellvermittelten Immunität handelt es sich um eine weitere Form der Immunität, die hauptsächlich auf der Funktionalität der T-Zellen beruht. T-Zellen bilden mit etwa 70 % den größten Anteil der Lymphozyten und damit den wichtigsten Teil des adaptiven Immunsystems (Murphy *et al.*, 2012). Sie entstehen aus pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks (primäres lymphatisches Organ) und differenzieren im Thymus in die jeweiligen T-Zell-Subtypen. Die Spezifität von Antigenrezeptoren wird durch eine negative bzw. positive Selektion der T-Zellen erreicht. Im Thymus werden hierbei Klone mit einer hohen Affinität zu autologen Antigenen depletiert bzw. Klone mit einer geringen Affinität weiter ausgereift (Delves und Roitt, 2009; Masopust und Schenkel, 2013; Klein *et al.*, 2014). Jede T-Zelle ist mit bis zu 30.000 identischen membranständigen T-Zell-Rezeptoren (*T cell receptor*, TCR) ausgestattet, die mit einer hohen Affinität ein spezifisches Antigen erkennen und binden (Murphy *et al.*, 2012). Der TCR ist ein Heterodimer, der aus einer α - und einer β -Kette besteht. Es handelt sich hierbei um Antikörper-ähnliche Proteine, deren Diversität auf einer variablen Kombinatorik aus V-, D- und J-Gensegmenten (*variable diversity, joining*) beruht und dadurch etwa 10^7 verschiedene TCR-Varianten ermöglichen (Jung und Alt, 2004; Murphy *et al.*, 2012). Im „*two-signal*“-Konzept (Bretscher, 1999) bedarf es neben der Antigenerkennung durch den TCR auch kostimulatorischer Signale durch die beiden B7-Proteine CD80 und CD86 (*cluster of differentiation*, CD), die auf Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APCs) exprimiert und von T-Zellen gebunden werden (via CD28) (Murphy *et al.*, 2012). Fehlende kostimulatorische Signale führen von Funktionsstörungen bis hin zur Untauglichkeit der T-Zellen (Grujic *et al.*, 2010). Bei Stimulation durch ein spezifisches Antigen sowie der kostimulatorischen Signale erfolgt eine regulierte Aktivierung und damit die Expansion bzw. Differenzierung der T-Zell-Klone (Murphy *et al.*, 2012). Inhibitorische Signale, die z.B. durch die Bindung von CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein-4*, CD152) an CD80/CD86 initiiert werden, regulieren die T-Zell-Aktivität und limitieren somit die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen (z.B. Interleukin-2, IL-2) (Murphy *et al.*, 2012;

Chen und Flies, 2013). Abhängig von der Dauer einer TCR-Stimulierung sowie dem auf die T-Zelle einwirkenden Zytokinmilieu kommt es während der Proliferation zur Ausbildung der 100- bis 10.000-fachen Menge an T-Effektor- und T-Gedächtniszellen (Stemberger *et al.*, 2007; Gerlach *et al.*, 2010; Murphy *et al.*, 2012). T-Gedächtniszellen sind langlebige T-Zellen, die einen Antigen-spezifischen TCR tragen und bei erneutem Antigenkontakt als primäre Immunantwort für eine schnelle und effektive (spontane) Immunantwort reaktiviert werden (Murphy *et al.*, 2012). Phänotypisch lassen sich T-Gedächtniszellen (CD45⁻) in CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen unterteilen (Delves und Roitt, 2009). Funktionell betrachtet lassen sich beide Phänotypen in Effektor-Gedächtnis T-Zellen (*effector memory T cells*, T_{EM}) und zentrale Gedächtnis T-Zellen (*central memory T cells*, T_{CM}) basierend auf der Expression des Chemokin-Rezeptors 7 (CCR7) und von L-Selektin (CD62L) klassifizieren. T_{CM} sind CCR7⁺ und exprimieren CD62L in hohem Maße. T_{EM} weisen eine heterogene Expression (niedrig/hoch) von CD62L auf und sind sowohl CCR7⁻ als auch CD45RA⁻ (Sallusto *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2010). T-Effektorzellen weisen dagegen eine eher kurze Lebensdauer auf und können in zwei Subtypen eingeteilt werden. Zytotoxische T-Zellen (CD8⁺) erkennen Antigene, die von APCs via Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC)-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden (Tough und Sprent, 1995; Murphy *et al.*, 2012). Die Aktivierung einer Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zelle führt zur Sekretion von zytolytischen Proteinen (z.B. Perforin) und Proteasen (z.B. Granzym B), die erst zur Perforierung und anschließend zur Lyse der Plasmamembran der erkannten Zelle führen. T-Helferzellen (CD4⁺) dagegen erkennen nur Antigene, die hauptsächlich von APCs, wie Makrophagen oder dendritischen Zellen, über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden. Ihre Funktion besteht in der Chemotaxis, d.h. durch die Sekretion chemischer Signalstoffe die Infiltration weiterer Immunzellen zu stimulieren. Je nach Antigen kann die Immunantwort bzw. das Profil an sekretierten Zytokinen variieren, welches zu einer weiteren Spezifizierung der T-Helferzellen führt. Man unterscheidet im Besonderen zwischen T_H1-, T_H2- und T_H17-Zellen, die sich grundlegend in der Sezernierung von IL-2, *Tumor Necrosis Factor-α* (TNF-α), Interferon-γ (IFN-γ) und IL-17 unterscheiden (Murphy *et al.*, 2012). Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) bilden eine Subpopulation der CD4⁺ T-Helferzellen, die durch die Expression des Transkriptionsfaktors *forkhead/winged-helix family* (FOXP3) charakterisiert sind. Je nach Ursprung unterscheidet man zwischen natürlichen und adaptiven T_{reg}-Zellen. Durchflusszytometrisch werden natürliche T_{reg}-Zellen mittels Kombinatorik der Oberflächenmarker CD3⁺CD4⁺CD25^{hoch}CD127^{niedrig} und der Expression von FOXP3 nachgewiesen. Sie bilden die größte Population regulatorischer T-Zellen und spielen eine wichtige Rolle bei der Homöostase von peripherer Immuntoleranz (Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003). Adaptive T_{reg}-Zellen (*inducible T_{reg}-Zellen*, iT_{reg}) exprimieren CD25 und FOXP3 erst nach Induzierung (Chatenoud und Bach, 2006) und besitzen zudem die Fähigkeit, sich variabel in T_H1 oder T_H17 Zellen umzuwandeln (Egwuagu, 2009). Nach erfolgreicher Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen supprimieren T_{reg}-Zellen durch Sekretion von IL-4, IL-10 und *Transforming Growth Factor-β* (TGF-β) die Effektorfunktion und verhindern dadurch Autoimmunerkrankungen (Longhi *et al.*, 2006). Diese immunsuppressive Eigenschaft von

humanen T_{reg}-Zellen wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als identisch beschrieben (Bilate und Lafaille, 2012). Typ-1 regulatorische (T_{reg}1) T-Zellen bilden eine weitere Population der regulatorischen T-Zellen, die sich durch IL-10 und IFN- γ induzieren lassen, jedoch nur eine beschränkte Proliferation aufweisen. T_{reg}1-Zellen weisen ein spezifisches Zytokin-Profil auf, bestehend aus IL-10 und IFN- γ , jedoch ohne IL-2 und IL-4 (Levings *et al.*, 2001). In ihrer Funktion beeinflussen sie die Sezernierung von Antikörpern durch B-Zellen (Jutel *et al.*, 2003) und inhibieren die Präsentation von Antigenen auf der Zelloberfläche von Monozyten (Cavani *et al.*, 2000). Typ-3-Helfer (T_H3) T-Zellen (Weiner, 2001) sowie CD8⁺ T_{reg}-Zellen bilden kleinere Subpopulationen regulatorischer T-Zellen, deren Funktionen noch kontrovers diskutiert wird (Kiniwa *et al.*, 2007; Le *et al.*, 2011; Chaput *et al.*, 2009).

1.3.3 Das Prinzip der Antigen-Präsentation

Bei Antigenen handelt es sich in der Regel um Proteine bzw. Proteinfragmente, die von APCs prozessiert und als kurze Fragmente auf der Zelloberfläche durch MHC-Moleküle präsentiert werden. T-Zellen erkennen spezifisch solche kurzen Peptidsequenzen, die man als Epitope bezeichnet (Murphy *et al.*, 2012). Epitope, die von T-Zellen erkannt werden und zu einer spontanen Immunantwort führen, werden im Verlauf dieser Arbeit als „reaktive Epitope“ bezeichnet.

Proteine weisen entsprechend ihrer Größe eine Vielzahl möglicher Epitope auf, was für die Spezifität der Immunantwort eine große Rolle spielt und ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit ist. Peptide mit einer Sequenzlänge von 8-10 Aminosäuren (AS) (MHC-Klasse-I) bzw. 12-24 AS (MHC-Klasse-II) werden durch Wasserstoffbrücken- und Ionenbindungen in der MHC-Bindungsspalte fixiert. MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle weisen polymorphe Eigenschaften auf, die ein umfangreiches Spektrum an Peptid-Bindemöglichkeiten ergeben (Delves und Roitt, 2009; Murphy *et al.*, 2012). Das humane Leukozytenantigen-System (*Human Leukocyte Antigen*, HLA) wird über die sechs Gene *HLA-A*, *-B* und *-C* (MHC-Klasse-I) sowie *HLA-DP*, *-DQ* und *-DR* (MHC-Klasse-II) auf dem *p*-Arm des Chromosoms 6 codiert (Delves und Roitt, 2009).

MHC-Klasse-I-Moleküle MHC-Klasse-I-Moleküle sind Monomere, die sich als integrale Membranproteine auf allen kernhaltigen Zellen des menschlichen Körpers befinden und hauptsächlich endogene Antigene präsentieren (Murphy *et al.*, 2012). Es zeigte sich jedoch, dass es durch Kreuzpräsentation auch zu einer Präsentation von exogenen Antigenen durch APCs wie Makrophagen und dendritischen Zellen kommen kann (Cresswell *et al.*, 2005). Durch MHC-Klasse-I präsentierte Antigene werden zuerst durch Vesikel internalisiert, im Proteasom fragmentiert und mittels Peptid-Transport (*transporter-associated with antigen processing*, TAP) in das endoplasmatische Retikulum überführt. Dort werden sie auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen und über den Golgi-Apparat vesikulär zur Zelloberfläche transportiert. Die Beladung von MHC-Klasse-I-Molekülen mit endogenen Antigenen erfolgt TAP-unabhängig

durch ein Golgi-Kompartiment (Murphy *et al.*, 2012). Des Weiteren können MHC-Klasse-I-Moleküle auch direkt durch Endosomen oder durch die Neusynthese von invarianten Ketten über den endozytotischen Weg beladen werden (Basha *et al.*, 2008, 2012). MHC-Klasse-I präsentierte Antigene werden spezifisch von CD8⁺ T-Zellen erkannt und initiieren die Ausbildung einer immunologischen Synapse. Durch eine zellvermittelte Zytotoxizität führt eine so aktivierte CD8⁺ T-Zelle zur Abtötung der Zielzelle (Huppa und Davis, 2003).

MHC-Klasse-II-Moleküle MHC-Klasse-II-Moleküle sind Heterodimere (α - und β -Kette), die auf der Oberfläche von B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert werden. Sie werden hauptsächlich von CD4⁺ T-Zellen erkannt, was die Proliferation von B-Zellen stimuliert und somit die Sekretion von Antikörpern bzw. eine humorale Immunantwort auslöst (Murphy *et al.*, 2012). Proteinfragmente werden durch Endozytose bzw. im Speziellen durch Makropinozytose (Lim und Gleeson, 2011) in die Zelle aufgenommen und endosomal bzw. lysosomal zu Peptiden fragmentiert (Watts, 2004). Die Fragmente werden anschließend durch eine Vielzahl komplexer Einzelschritte an die N-terminalen Domänen des Heterodimers gebunden (Blum *et al.*, 2013) und durch Vesikel an die Plasmamembran transportiert (Chow *et al.*, 2002).

1.4 Die Sonderstellung des zentralen Nervensystems

Basierend auf experimentellen Beobachtungen, bei denen gezeigt wurde, dass Hautgewebe bei einer heterotropen Transplantation ins ZNS durch das Fehlen von Immunzellen länger überlebten als bei Transplantationen in andere Gewebe, galt das ZNS im nicht-pathologischen Zustand lange Zeit als immunprivilegiertes Organ (Medawar, 1948).

Durch die protektive Funktion der Blut-Hirn-Schranke (*blood-brain barrier*, BBB) (Wilson *et al.*, 2010) und dem vermuteten Fehlen von Lymphgefäßen ist die Akquirierung von Immunzellen im ZNS, basierend auf dem Dogma des menschlichen Abwehrsystems, deutlich limitiert (Barker und Billingham, 1977; Hickey *et al.*, 1991). Besonders die molekularen Abwehrmechanismen, mit denen das Immunsystem Pathogene und Fremdstoffe bekämpft, können im ZNS zu neuronalen Dysfunktionen führen, die Nervenzellen irreversibel schädigen (z.B. Multiple Sklerose) (Dutta und Trapp, 2011).

In den letzten Jahrzehnten zeigte sich jedoch, dass diese Annahmen nicht uneingeschränkt zutreffend sind und es manifestierte sich die Auffassung, dass es sich bei dem ZNS um ein eingeschränkt immunkompetentes Organ handeln muss (Carson *et al.*, 2006). Kleine Moleküle, wie lipidlösliche Substanzen, können die Endothelschicht der BBB perfundieren. Größere Bestandteile, wie z.B. Metabolite und Nährstoffe, werden über Transporterproteine aktiv ins ZNS geleitet bzw. Stoffwechselprodukte abgeleitet. Neben schädlichen Substanzen wie Pathogenen und Toxinen wird aber auch die Einwanderung von Immunzellen durch die BBB streng kontrolliert, um dadurch das Risiko von entzündlichen Reaktionen

bzw. die damit verbundenen neurodegenerativen Schäden zu minimieren (Banks, 2009).

Gewebespezifische Mechanismen wie die Expression von *Fas Ligand* (FasL) (Flügel *et al.*, 2000), *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) (Aktas *et al.*, 2005) oder CD200 (Copland *et al.*, 2007), kontrollieren durch ihre multifunktionalen Eigenschaften zusätzlich die Funktionalität infiltrierender Zellen. Besonders am Beispiel von FasL wird deutlich, dass der Ligand gleichzeitig sowohl Entzündungsreaktionen unterstützen (Askenasy *et al.*, 2005; Gregory *et al.*, 2005) als auch die Apoptose aktivierter T-Zellen induzieren kann (Dick *et al.*, 1999). Auch der Austausch von ZNS-Antigenen und T-Zellen mit dem lymphatischen System, beispielsweise über den Virchow-Robin-Raum, ist bekannt und wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (Goldmann *et al.*, 2006; van Zwam *et al.*, 2009).

Man geht davon aus, dass Lymphozyten primär über i) die Choroid-Plexus-Kapillare in die zerebrale Flüssigkeit, ii) vom Blut in den subarachnoidalen Raum (Virchow-Robin-Raum), oder iii) vom Blut ins ZNS-Parenchym gelangen (Ransohoff *et al.*, 2003). Zusätzlich konnten erst vor kurzem Gefäße identifiziert werden, welche eine direkte Verbindung zwischen der zerebralen Flüssigkeit und den tiefliegenden zervikalen Lymphknoten darstellen und alle charakteristischen Eigenschaften eines Lymphsystems aufweisen (Louveau *et al.*, 2015). Außerdem sind immunologische Reaktionen besonders im Kontext von pathologischen Situationen wie beispielsweise bei LGGs (Beckhove *et al.*, 2010) und bei GBMs (Fadul *et al.*, 2011) aber auch der Autoimmun-Enzephalitis, der Multiplen Sklerose (Goverman, 2009; Fletcher *et al.*, 2010) und bei Schlaganfällen erforscht (Chamorro *et al.*, 2012). Besonders bei der Multiplen Sklerose, einer chronisch, entzündlich-entmarkenden Erkrankung des Gehirns konnten ZNS-spezifische autoreaktive T-Zellen mit einer hohen Frequenz im peripheren Blut der Patienten nachgewiesen werden (Crawford *et al.*, 2004).

1.4.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Die BBB bildet eine physikalische Permeabilitätsbarriere und trennt den intravasalen (Blut) vom extravasalen (Gehirn, Rückenmark) Raum, wodurch sie die Homöostase des ZNS ermöglicht (Pachter *et al.*, 2003). Besonders im Hinblick auf die fluktuierenden Konzentrationen an Ionen, Aminosäuren, Hormonen oder Neurotransmittern im Blut nach der Nahrungsmittelaufnahme oder sportlichen Aktivitäten wird dadurch ein Schutz vor unkontrollierbaren, neuronalen Aktivitäten oder auch reversiblen Schäden im ZNS gewährleistet (Smith, 2000). Die BBB wurde zum ersten Mal im Jahr 1885 von Paul Ehrlich beschrieben und besteht hauptsächlich aus dem Kapillarendothel der Blutgefäße, welches von einer lückenlosen Basalmembran sowie Perizyten und Astrozyten umhüllt ist (Bergers und Song, 2005). Die Endothelzellen der Mikrokapillaren des ZNS (*brain microvascular endothelial cells*, BMECs) sind durch sogenannte Zell-Zell-Kontaktproteine (*tight junctions*) sehr eng miteinander verbunden und kontrollieren die parazelluläre Diffusion von Molekülen über die BBB (Krause *et al.*, 2008). Typische Bestandteile der *tight junctions* sind die Transmembranproteine Claudin und Occludin sowie diverse verbindende Adhäsionsmolekü-

le (*junction adhesion molecules*, JAM-A,-B,-C) (Abbott *et al.*, 2006). Der transendotheliale Widerstand (*transepithelial/transendothelial electrical resistance*, TEER), ein Maß für die Durchlässigkeit der BBB, ist bei BMECs durch die strukturellen Besonderheiten um ein Vielfaches höher als bei Kapillaren im restlichen Organismus (Butt *et al.*, 1990; Nakagawa *et al.*, 2009). Obwohl die genauen Mechanismen der Permeabilitätskontrolle noch nicht vollständig geklärt sind, gibt es verschiedene Erklärungsansätze, die die Funktionen der einzelnen zellulären Bestandteile der BBB genauer charakterisieren. Bei der Basalmembran handelt es sich um einen Monolayer aus Laminin, Fibronectin und Typ-IV-Kollagen, welche die erste Schicht bilden und von BMECs vollständig umgeben sind (Aumailley *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 2007). Der Durchmesser kann bis zu 100 nm erreichen und ist essenziell für die Funktionalität der BBB (Nag, 2003; Hartmann *et al.*, 2007). Astrozyten spielen in vielerlei Hinsicht eine wichtige Rolle im Gehirn. Morphologisch betrachtet interagieren sie direkt mit BMECs, da sie Kapillargefäße vollständig mit den Zellfortsätzen umschließen (Abbott, 2002; Abbott *et al.*, 2006). Zusätzlich regulieren sie die Bindestärke der *tight junctions* durch die Expression von Enzymen wie beispielsweise der γ -Glutamyltransferase 1 (GGT), aber auch durch die Polarisierung von Transportern und Oberflächenrezeptoren, wodurch sie direkt die Durchlässigkeit der BBB beeinflussen (Abbott, 2002; Hartz *et al.*, 2004; Abbott *et al.*, 2006). Astrozyten verbinden Kapillargefäße mit den Synapsen, regulieren das Ionenmilieu im Extrazellulärraum des Gehirns und gleichen den Sauerstoff- bzw. Glukosetransport an neuronale Aktivitäten an (Zonta *et al.*, 2003; Iadecola und Nedergaard, 2007). Perizyten sind nur durch eine dünne Schicht der vaskulären Basalmembran von den BMECs separiert und umschließen die Kapillargefäße ebenfalls komplett. Mit ihren Zellfortsätzen bilden sie diskontinuierliche Netzwerke, die sich intra- als auch interkapillar entwickeln können (Bergers und Song, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Perizyten besonders während der Entwicklung des ZNS maßgeblich an der Ausbildung sowie Funktionalität der BBB beteiligt sind (Daneman *et al.*, 2010). Zusätzlich besitzen sie kontraktile Eigenschaften, wodurch die Plastizität der Kapillargefäße beeinflusst und somit der Gefäßtonus reguliert wird (Hamilton *et al.*, 2010). Neben verschiedenen phagozytotischen Eigenschaften interagieren Perizyten ebenfalls mit proliferierenden Endothelzellen und unterstützen die Stabilisierung von neugebildeten Gefäßstrukturen, was ihre Rolle in der Angiogenese hervorhebt (Egginton *et al.*, 1996; Bergers und Song, 2005).

Pathologische Veränderungen der BBB und deren therapeutische Relevanz Besonders in pathologischen Situationen erschwert die eben beschriebene Schutzfunktion des ZNS allerdings die medikamentöse Behandlung, da die Wirkstoffe die BBB nicht ohne weiteres überwinden können (Hawkins und Davis, 2005; Pardridge, 2010). Auch wenn man weitläufig davon ausgeht, dass die Integrität der BBB mit ansteigender Malignität der Gliome abnimmt, bzw. es zur partieller Durchlässigkeit kommt, bleibt die Funktion der BBB im Großteil des Kapillarsystems nachweislich bestehen (Agarwal *et al.*, 2013). Durch die Freisetzung von Angiopoietinen und Wachstumsfaktoren (z.B. *Vascular Endothelial Growth Factor A* (VEGF), *Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor* (HGF/SF)) wird die der Tumorgroße und -form

angepasste Neubildung und Einsprossung von Blutgefäßen reguliert (van Tellingen *et al.*, 2015). Dabei zeigen besonders Gefäßstrukturen, die nicht im Tumorzentrum liegen, keine Anzeichen einer erhöhten oder veränderten Durchlässigkeit (Agarwal *et al.*, 2013). Im Tumorzentrum kommt es dagegen durch Hypoxie zur Ausbildung von nekrotischen Bereichen, in denen die BBB eine zunehmende Permeabilität aufweist (Yeh *et al.*, 2007). Während sich im Tumorzentrum daher häufig signifikante Anreicherungen von therapeutischen Molekülen nachweisen lassen, zeigen Bereiche, wie beispielsweise die Infiltrationszone vergleichbare Werte wie im Normalgewebe (Agarwal *et al.*, 2013). Dies lässt vermuten, dass proliferierende und migrierende Tumorzellen in den infiltrierenden Randbereichen des Tumors durch die Schutzfunktion der BBB kaum bis gar nicht therapierbar sind. Dies stellt besonders für die Therapie mit niedermolekularen Substanzen und Antikörpern eine große Herausforderung dar (van Tellingen *et al.*, 2015). Gezielte, nicht-invasive Ansätze ermöglichen jedoch bereits, die Durchlässigkeit der BBB temporär zu erhöhen, um damit ein therapeutisches Fenster für eine effektivere Behandlung zu generieren (McDannold *et al.*, 2012; Bleier *et al.*, 2013; Klug *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015; Leuthardt *et al.*, 2016).

1.4.2 Das Immunsystem der Gliome

Obwohl das ZNS als eingeschränkt immunkompetentes Organ angesehen wird, verdeutlicht sich in pathologischen Situationen jedoch sehr wohl, dass es zu umfangreichen Interaktionen zwischen dem ZNS und dem peripheren Immunsystem kommen kann (Ransohoff *et al.*, 2003). Besonders im Kontext maligner ZNS-Erkrankungen, wie beispielsweise dem GBM, bilden periphere mononukleäre Zellen, wie z.B. Makrophagen, T-Zellen (Lohr *et al.*, 2011), aber auch B-Zellen und NK-Zellen den größten Anteil infiltrierender Immunzellen (Domingues *et al.*, 2016). Im Folgenden werden die Funktionen der eben genannten Zellpopulationen im Kontext der Tumor-Mikroumgebung bei Gliomen erläutert und ihre Bedeutung für spontane Immunantworten gegen Tumorantigene beschrieben.

Mikroglia Mikroglia gelten als die ortsständigen Gewebsmakrophagen des Gehirns (Chan *et al.*, 2007). Mikroglia, die im gesunden Gehirn in ihrem Normalzustand als ruhende Zellen vorkommen, werden beispielsweise durch Gliom-charakteristische Zytokine wie TGF- β , *Monocyte Secretory Protein-1* (MCP-1), *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) und *C-C Motif Chemokine Ligand 2* (CCL2) aktiviert (Hinojosa *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). Man geht davon aus, dass diese Zytokine nicht nur die Aktivierung der Mikroglia bewirken, sondern auch als Chemoattraktant die aktive Rekrutierung der Zellen in den Tumor unterstützen. In Gliomen kann der Anteil an Gliom-assoziierten Mikroglia und Makrophagen (*glioma associated microglia and macrophages*, GAMs), welche den Marker *Macrophage Antigen* CD68⁺ exprimieren, auf 10 % in LGGs und auf 13,4 % in GBMs ansteigen (Simmons *et al.*, 2011). Die prognostische Relevanz der CD68⁺-GAMs zeigt sich sowohl in der Korrelation mit der Malignität (Komohara *et al.*, 2008) als auch im progressionsfreien Überleben, wie bspw. bei pilozytischen

Astrozytomen (Dorward *et al.*, 2010). Aufgrund unterschiedlicher Wirkmechanismen und Fähigkeiten, Antigene zu präsentieren (Wlodarczyk *et al.*, 2014), ist es wichtig, zwischen residenten Mikroglia und peripheren Makrophagen zu unterscheiden, deren Anteil sich in pathologischen Situationen durch Infiltration von Monozyten erhöht. In einem *Parabiosis*-Modell konnte beispielsweise durch permanente Zellmarkierung die Einschwemmung von Monozyten und deren prognostische Rolle nachgewiesen werden (Ajami *et al.*, 2011). Durch die GAM-Klassifizierung anhand der differentiellen Expression des *Leukocyte Common Antigen* CD45 konnte gezeigt werden, dass es sich bei einem Großteil der Zellen tatsächlich um periphere Monozyten (CD45^{hoch}) handelt (Parney *et al.*, 2009). Widersprüchliche Erkenntnisse dazu lieferten Versuche an chimären Mäusen, bei denen nach Bestrahlung gezeigt wurde, dass hirneigene Mikrogliazellen (CD45^{niedrig}) durch die Hochregulierung von CD45 fälschlicherweise als periphere Monozyten klassifiziert wurden (Müller *et al.*, 2015). Ungeachtet der Herkunft weisen GAMs neben den immunologischen Funktionen auch immunsuppressive bzw. tumorsupportive Wirkmechanismen auf. Man unterscheidet hierbei zwischen dem pro-inflammatorischen (M1) und dem anti-inflammatorischen (M2) Phänotyp, die sich in *in vitro* (Stimulation) oder *in vivo* (Mikroumgebung) ausprägen. Während sich der M1-Phänotyp durch IFN- γ und Aktivierung des *Toll-like receptors 4* (TLR4) entwickelt, differenzieren Makrophagen in Anwesenheit von IL-4, IL-10 und IL-13 zum M2-Phänotyp (Mantovani *et al.*, 2002). Zur Charakterisierung von GAMs werden Oberflächenrezeptoren, wie bspw. CD206, CD163, CD204, CD354, *Mannose Receptor-C Type 1* (MRC1), *Transglutaminase 2* (TGM2), CD23 und CCL22 dazu genutzt, um die Polarisierung von M1- oder M2-Makrophagen genauer zu untersuchen (Munder *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2001; Hung *et al.*, 2002; Kowal *et al.*, 2011). Eine weiterführende Klassifizierung des M2-Phänotyps wurde hauptsächlich an peripheren Makrophagen durchgeführt. Die Klassifizierung beruht auf funktionellen Unterschieden, der differentiellen Expression von Oberflächenrezeptoren, sowie Zytokin-, Chemokin- und Genexpressionsprofilen und wurde als M2a-, M2b- und M2c-Makrophagen definiert (Mantovani *et al.*, 2002; David und Kroner, 2011; Chhor *et al.*, 2013). Inwiefern die M2-Subklassifizierung jedoch eine Rolle bei GAMs bzw. residenten Mikroglia spielt, ist bisher noch nicht geklärt. Erste Erkenntnisse weisen aber auf eine gewisse Inkompatibilität hin, da einige Makrophagen-Marker wie beispielsweise CD206 bei Mikroglia im ZNS nicht exprimiert werden (Galea *et al.*, 2005; Cherry *et al.*, 2014). Besonders der M2-Phänotyp, der sich in Gliomen durch die erhöhte Konzentration an M-CSF und IFN- γ ausbildet, fördert direkt die Gliomgenese und korreliert mit einer schlechten Überlebensprognose (Komohara *et al.*, 2008; Pyonteck *et al.*, 2013a; Geisenberger *et al.*, 2015). Durch die prognostische Relevanz des M2-Phänotyps liegt ein besonderer Forschungsschwerpunkt in der therapeutischen Repolarisierung des M2- zum M1-Phänotyp und damit der Remodellierung einer pro-inflammatorischen Tumor-Mikroumgebung (Pyonteck *et al.*, 2013b; Ries *et al.*, 2014; Qin *et al.*, 2015).

T-Zellen T-Zellen sind in ZNS-Neoplasien die wohl am umfangreichsten charakterisierten Immunzellen. Sie lassen sich, wie bereits beschrieben, in drei funktionelle Kategorien unterteilen: CD4⁺ T-Helferzellen, CD8⁺ zytotoxische T-Effektorzellen und regulatorische T-Zellen.

Durch die Sekretion verschiedener Zytokine regulieren und steuern CD4⁺ T-Helferzellen den Verlauf immunologischer Reaktionen. Diese umfassen sowohl zelluläre (Th1) als auch humorale Immunantworten (Th2) (Murphy *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu sind CD8⁺ zytotoxische T-Effektorzellen in der Lage, erkannte Zielzellen direkt zu lysieren, weshalb sie die wichtigste Komponente der zellulären Immunantwort darstellen (Murphy *et al.*, 2012).

Obwohl sich Tumor-infiltrierende Lymphozyten (*tumor infiltrating lymphocytes*, TILs) in verschiedenen Neoplasien wie beispielsweise dem Melanom (Oble *et al.*, 2009), dem Ovarialkarzinom (Hwang *et al.*, 2012) oder dem kolorektalen Karzinom (Galon *et al.*, 2006) als prognostischer Marker etabliert haben, scheint die absolute Quantität Tumor-infiltrierender CD3⁺ T-Zellen bei Gliomen nicht eindeutig positive mit dem Patientenüberleben zu Korrelieren (Dunn *et al.*, 2007; Han, 2014).

Während Daten aus unserer sowie anderen Arbeitsgruppen unter anderem einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer hohen Infiltration von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen und dem Überleben bei GBM-Patienten beschreiben (Lohr *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012; Kmiecik *et al.*, 2013), scheint insbesondere auch das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen. Wie durch Yu *et al.* publiziert, prognostiziert ein niedriges CD4/CD8-Verhältnis beispielsweise einen besseren Verlauf der Gliom-Erkrankung (Yu *et al.*, 2003). Umgekehrt weisen Gliome mit einem kurzen progressionsfreien Überleben bzw. einem kurzen Gesamtüberleben daher häufig ein hohes CD4/CD8-Verhältnis auf (Han, 2014). Neben der Quantität von TILs, welche mit der Malignität korreliert (Heimberger, 2008b; Lohr *et al.*, 2011), scheint besonders die Qualität der TILs bzw. die Funktionalität der beispielsweise zytotoxischen T-Zellen eine große Rolle bei ZNS-Tumoren zu spielen (Lou *et al.*, 2015). Sowohl die Tumorzellen als auch die Mikroumgebung beeinflussen jedoch die Klonalität und Funktionalität von Tumor-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und unterstützen dadurch den Vorgang des sogenannten „*immune-escapes*“ (Masson *et al.*, 2007).

Durch die Sekretion entsprechender Zytokine sind beispielsweise CD4⁺ T-Zellen in der Lage, Veränderungen in der Tumor-Mikroumgebung hervorzurufen und unterstützen somit die Polarisierung von M1- zu M2-Mikroglia (Tiemessen *et al.*, 2007; Biswas und Mantovani, 2010). Durch ihre immunregulatorischen Fähigkeiten stellen T_{reg}-Zellen und deren Auswirkung auf die Tumor-Mikroumgebung daher einen großen Forschungsschwerpunkt dar. Auch wenn T_{reg}-Zellen eher selten und in geringer Anzahl vorkommen, sind sie in der Lage, durch die Sekretion von u.a. IL-10 und TNF- α die Proliferation von T-Zellen zu inhibieren (Jarnicki *et al.*, 2006; Lohr *et al.*, 2011). Ergebnisse unserer sowie anderer Arbeitsgruppen konnten für T_{reg}-Zellen jedoch keine prognostische Relevanz nachweisen (Heimberger, 2008b; Lohr *et al.*, 2011). Verschiedene therapeutische Ansätze versuchen jedoch, T_{reg}-Zellen zu inhibieren oder sogar zu depletieren, um dadurch die Effektivität von Immuntherapien zu verstärken (Plautz *et al.*,

2000; Höltl *et al.*, 2004).

NK-Zellen Als zytotoxische Lymphozyten können NK-Zellen die Apoptose von Tumorzellen mit fehlenden MHC-Klasse-I-Molekülen induzieren und spielen daher ebenfalls eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem. Besonders Stammzell-ähnliche Gliomzellen (*Gliom-Stem-like Cells*, GSCs), welche nur eine geringe Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen aufweisen, sind sehr anfällig für eine NK-Zell-basierte Zytotoxizität (Castriconi *et al.*, 2009). Zusätzlich exprimieren GSCs Liganden welche die Rezeptoren NKp46 und DNAM-1 stimulieren und damit die Aktivierung von NK-Zellen fördern bzw. die Bekämpfung der Tumorzellen unterstützen (Castriconi *et al.*, 2009). Durch die Sekretion von Granzym B und Perforin aber auch durch die Expression von TNF-Liganden auf der Zelloberfläche besitzen NK-Zellen somit zwei voneinander unabhängige Mechanismen der Zytotoxizität (Mirandola *et al.*, 2004; Rousalova und Krepela, 2010). Während in vielen Tumorentitäten eine erhöhte NK-Zell-Infiltration mit einem besseren Patientenüberleben korreliert, konnte dies für ZNS-Tumore bisher jedoch noch nicht gezeigt werden (Ishigami *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2003; Hsia *et al.*, 2005).

B-Zellen B-Zellen werden im Knochenmark gebildet und reifen in sekundären lymphatischen Organen zu naiven B-Zellen heran (Murphy *et al.*, 2012). Wie bereits zuvor bei der adaptiven Immunantwort beschrieben, differenzieren Antigen-spezifische B-Zellen nach Aktivierung entweder zu B-Gedächtniszellen oder zu langlebigen Plasmazellen, welche Antigen-spezifische Immunglobuline sekretieren (Pieper *et al.*, 2013). B-Zellen besitzen durch die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen (Chen und Jensen, 2004) die Fähigkeit, Antigene als APCs zu präsentieren und somit die Immunantwort von Antigen-spezifischen T-Zellen zu stimulieren (Candolfi *et al.*, 2011). Sie werden häufig in der Nähe von T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) oder DCs nachgewiesen (Nelson, 2010) und korrelieren in Tumorentitäten wie beispielsweise dem Brustkrebs (Schmidt *et al.*, 2008) oder dem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (Al-Shibli *et al.*, 2008) mit einem besseren Patientenüberleben. Sowohl in Gliomen als auch in Meningiomen konnte jedoch nur eine geringe B-Zell-Infiltration nachgewiesen werden (Yang *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2013). Da unter anderem aber auch gezeigt wurde, dass B-Zellen Immunantworten supprimieren können und durch die Sekretion von IL-10 die Polarisierung von Mikroglia beeinflussen, ist die genaue Rolle und Funktion der B-Zellen noch nicht vollständig geklärt (Biswas und Mantovani, 2010).

1.4.3 Auswirkungen der Mikroumgebung auf das Immunsystem

Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, unterscheidet sich die ZNS-Mikroumgebung grundlegend von der in anderen Organen des menschlichen Körpers. Zusätzlich generieren Gliome, ähnlich wie andere Tumorentitäten, ihre eigene immunsuppressive bzw. tumorsupportive Mikroumgebung (Hanahan und Weinberg, 2011; Razavi *et al.*, 2016). Die Effektivität der immunologischen Abwehrmechanismen bei Gliom-

Patienten unterliegen daher nicht nur dem Einfluss von systemischen sondern besonders auch lokalen Faktoren.

Systemische Faktoren Systemische Faktoren umfassen Therapie-bedingte Einflüsse und Veränderungen, welche das Immunsystem der Gliom-Patienten beeinträchtigen. So schädigen beispielsweise die Nebenwirkungen der GBM-Standardtherapie (Stupp *et al.*, 2005) die Knochenmarkfunktion und verursachen somit häufig eine sogenannte Lymphopenie, d.h. einen Mangel an immunkompetenten Lymphozyten bzw. T-Zellen (Gilbert *et al.*, 2009; Jackson *et al.*, 2011). Des Weiteren werden bei der Behandlung von Gliomen häufig auch Kortikosteroide eingesetzt, um die Bildung von Hirnödemen zu verringern (Dubois *et al.*, 2014). Neben dem gewünschten anti-inflammatorischen lokalen Effekt inhibieren Kortikosteroide jedoch gleichzeitig die systemischen Abwehrmechanismen des Körpers und wirken daher suppressiv auf das Immunsystem (Grossman *et al.*, 2011). Weitere Tumor-bedingte systemische Faktoren beinhalten immunologische Fehlregulationen, wie eine reduzierte Expression von HLA-Molekülen auf Monozyten (Woiciechowsky *et al.*, 1998) oder ein eingeschränktes Differenzierungsvermögen von dendritischen Zellen (Ogden *et al.*, 2006).

Lokale Faktoren Zu den lokalen Faktoren der ZNS-Mikroumgebung gehört in erster Linie die BBB, welche die Infiltration von Immunzellen streng reguliert, wodurch das ZNS im gesunden Normalzustand als immunprivilegiert erachtet wird (Pachter *et al.*, 2003) (siehe Kapitel 1.4). Die Funktionalität von ZNS-infiltrierenden T-Zellen wird zusätzlich durch die Interaktion des Zelltod-induzierenden Fas-Liganden (FasL) mit dem Fas-Rezeptor (FasR) eingeschränkt, welcher auf Astrozyten (Choi *et al.*, 1999), Mikroglia (Badie *et al.*, 2001) und Neuronen (Flügel *et al.*, 2000) exprimiert wird.

Im pathologischen Zustand wie beispielsweise bei Gliomen nehmen die Einflüsse von lokalen Faktoren auf das Immunsystem jedoch mit ansteigender Malignität zu (Razavi *et al.*, 2016). Gliomzellen *per se* besitzen eine Vielzahl immunprotektiver Wirkmechanismen, mit denen sie sich vor Immunreaktionen schützen. Basierend auf dem Konzept des „*immunoediting*“ fördern Tumore nach der ersten Konfrontation mit dem Immunsystem (*elimination*) die Proliferation von immunresistenten Tumorzellen (*equilibrium*), um sich dadurch der Überwachung des Immunsystems zu entziehen (*escape*) (Dunn *et al.*, 2002, 2004). Mechanismen, die eine tumorsupportive bzw. immunsuppressive Mikroumgebung generieren, beinhalten unter anderem das Herabregulieren der MHC-Moleküle (Zagzag *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2006) oder die Expression von PD-L1 (B7-H1) Membranproteinen (Wintterle *et al.*, 2003). Weitere Veränderungen wie eine Zunahme an TILs (Lohr *et al.*, 2011) oder GAMs (Hussain *et al.*, 2006; Simmons *et al.*, 2011) aber auch die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen durch Tumorzellen verändern das Spektrum lokaler Faktoren in der ZNS-Mikroumgebung bei Gliomen (Razavi *et al.*, 2016). Immunsuppressive Zytokine wie beispielsweise IL-6, IL-10 und TGF- β aber auch tumorsupportive Zytokine wie IL-1 und bFGF sind Faktoren, die die Effektivität einer Tumor-gerichteten Immunantwort einschränken

(Jackson *et al.*, 2011). TGF- β beispielsweise inhibiert die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen und fördert unter anderem die Infiltration von T_{reg}-Zellen (Tiemessen *et al.*, 2003; Vega *et al.*, 2008). Auch wenn diese in Gliomen eher selten vorkommen, tragen sie aktiv zur Immunsuppression bei (Jacobs *et al.*, 2009; Lohr *et al.*, 2011). Das Zytokin IL-10 korreliert unter anderem positiv mit dem Tumorwachstum bei GBMs, reduziert die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen und fördert die Anergie bei TILs (Huettner *et al.*, 1997; Strle *et al.*, 2001; Bloch *et al.*, 2013).

Bei entzündlichen Prozessen, wie beispielsweise hohen Konzentrationen an IFN- γ , steigt die Expression von PD-L1, einem sogenannten Immun-Checkpoint-Regulator, welcher unter anderem auf Mikrogliazellen exprimiert wird und ebenfalls zur Beeinträchtigung von T-Zellen führen kann bzw. die Apoptose induziert (Dong *et al.*, 2002; Magnus *et al.*, 2005). Die therapeutische Relevanz der Inhibition solcher Immun-Checkpoint-Regulatoren konnte bereits in anderen Tumorentitäten wie beispielsweise bei Brustkrebs, dem Melanom oder dem Kolonkarzinom gezeigt werden und könnte daher auch in der Mikroumgebung von Gliomen eine entscheidende Rolle spielen (Ene und Holland, 2015; Jiang *et al.*, 2015).

1.4.4 Ansätze zur immuntherapeutischen Behandlung von Gliomen

Während die Identifizierung der ersten Tumorantigene im Jahre 1991 die Grundlage für verschiedene immuntherapeutische Behandlungsformen legte (van der Bruggen *et al.*, 1991; Galluzzi *et al.*, 2014), befindet sich deren Anwendung bei Gliomen heutzutage immer noch in einer frühen Entwicklungsphase. Das zunehmende Verständnis über die Biologie, molekulare Charakteristika sowie den klinischen Verlauf von Gliomen ermöglicht jedoch die Entwicklung einer zunehmend personalisierten Medizin (Ene und Holland, 2015). Besonders hier zeigt die Immuntherapie durch ihre Vielfalt an Zielstrukturen bzw. Wirkmechanismen und die vergleichsweise geringen systemischen Nebenwirkungen eine Vielzahl erfolgversprechender Ansätze (Galluzzi *et al.*, 2014). Monoklonale Antikörper beispielsweise können die Proliferation von Tumorzellen entweder direkt oder indirekt inhibieren (Scott *et al.*, 2012). Der EGFR-Inhibitor Cetuximab beispielsweise blockiert direkt den auf Tumorzellen exprimierten EGF-Rezeptor und führt gleichzeitig zu einer antikörperabhängigen zellvermittelten Toxizität (Kimura *et al.*, 2007). Bevacizumab hingegen inhibiert die Angiogenese durch Blockierung des VEGF-Signalweges und führt somit zu einer indirekten Hemmung des Tumorwachstums (Ferrara *et al.*, 2004). Adaptive T-Zelltherapien (passive Immuntherapie) zielen darauf ab, autologe T-Zellen zu isolieren und *ex vivo* zu expandieren (Tsuboi *et al.*, 2003) bzw. sie mit tumorspezifischen TCRs zu modifizieren (*chimeric antigen receptors*, CARs) und sie anschließend für eine effiziente und zielgerichtete Immunantwort in den Patienten zu re-injizieren (Chow *et al.*, 2012). Immun-Checkpoint-Inhibitoren regulieren Immunreaktionen durch Blockade immunsuppressiver Membranproteine (Palucka und Coussens, 2016). Die komplementären Rezeptoren *programmed death 1* (PD1) und *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* (CTLA4) beispielsweise führen nach Aktivierung zur Suppression T-Zell-vermittelter Immunreaktionen (Crawford und Wherry, 2009). Die Effek-

tivität einzelner Immun-Checkpoint-Inhibitoren (α -CTLA4-MAb = Ipilimumab; α -PD1-MAb = Nivolumab) divergiert allerdings sowohl zwischen Tumorentitäten als auch Patientengruppen durch genomische Variabilitäten (Snyder *et al.*, 2014; Le *et al.*, 2015; McGranahan *et al.*, 2016).

Therapeutische Tumor-Vakzinen Impfungen haben in den letzten Jahrzehnten erfolgreich dazu beigetragen, die Ausbreitung von Krankheiten, wie unter anderem Tetanus, Polio und Diphtherie einzuschränken und sogar gänzlich auszurotten (Fenner *et al.*, 1987). Entsprechend repräsentieren Tumorspezifische Impfstoffe (aktive Immuntherapie) daher eine vielversprechende Behandlungsform, die die körpereigene Immunabwehr gezielt gegen entartete Tumorzellen mobilisieren soll. Therapeutische Vakzinen gegen Krebs basieren auf Tumor-spezifischen Charakteristika, die sich auf gesunden Körperzellen kaum oder nur schwach finden lassen. Bei Tumorlysate-Vakzinen wird zum Beispiel das Gewebelysate dazu genutzt, autologe dendritische Zellen zu beladen und somit effektiv eine umfangreiche Stimulierung (*cross-stimulation*) der zytotoxischen T-Zellen sowie T-Helferzellen zu erreichen (Ardon *et al.*, 2012). Man umgeht dadurch die Restriktion, sich auf einzelne Peptidsequenzen sowie Antigen-präsentierende MHC-Moleküle festzulegen. Eine Charakterisierung sowie Beurteilung der Qualität bzw. Quantität der Peptidsequenzen, die zu einer spontanen Immunantwort führen, kann jedoch nicht getroffen werden. Erste klinische Versuche bestätigten sowohl die Unbedenklichkeit (Caruso *et al.*, 2004) als auch die Effektivität (Ardon *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2004) dieses Verfahrens.

Weitere Ansätze Tumor-spezifischer Impfstoffe beinhalten die Verwendung von Tumor-spezifischen Antigenen (TSAs) sowie Tumor-assoziierten Antigenen (TAAs) und werden daher im Weiteren detailliert erläutert. TSAs finden sich ausschließlich in Tumorzellen und lassen sich beispielsweise durch Exom-Sequenzierung (*whole-exome sequencing*) nachweisen (Robbins *et al.*, 2013). Die sogenannten Neo-Epitope entstehen durch Tumor-spezifische Mutationen, wobei ihre Häufigkeit stark von der spezifischen Mutationsrate der jeweiligen Neoplasie abhängt (Schumacher und Schreiber, 2015). Während Neo-Epitope bei Hautkrebs eine sehr große Rolle spielen, ist die Anzahl an mutierten Antigenen in LGGs eher gering (Lawrence *et al.*, 2013). TSAs führen *in vitro* häufig zu starken T-Zell-vermittelten Immunantworten, da diese nicht im Thymus exprimiert und T-Zellen somit nicht aufgrund der negativen Selektion depletiert werden (Reardon *et al.*, 2014). Beispiele von TSA-Vakzinen, deren therapeutischer Nutzen momentan bei Gliom-Patienten untersucht werden, sind beispielsweise die Peptide EGFRvIII bei pGBM-Patienten (NCT01480479, Phase III) und rGBM-Patienten (NCT01498328, Phase III) sowie IDH1R132H bei IDH^{mut} WHO^oIII-IV Gliomen (NCT02454634, Phase I) und rezidierten WHO^oII Gliomen (NCT02193347, Phase I).

Bei der Zielstruktur EGFRvIII handelt es sich beispielsweise um eine Deletionsvariante des häufig über-exprimierten EGF-Rezeptors, welche in etwa 30 % der Tumore nachweisbar ist (Wong *et al.*, 1992; Humphrey *et al.*, 1990). Der Verwendung der EGFRvIII-Vakzine, welche aus einem synthetischen Peptid (14 AA) besteht (Rindopepimut, Celldex Therapeutics), führte in präklinischen Versuchen zu spe-

zifischen humoralen sowie zellulären Immunantworten (Heimberger *et al.*, 2003). Die klinische Relevanz der Impfung, die sich in einer Phase-II-Studie durch einen besseren Krankheitsverlauf der vakzinieren Patienten zeigte (Heimberger, 2008a; Sampson *et al.*, 2009, 2011), konnte in der Phase-III-Studie an pGBMs jedoch nicht bestätigt werden (<http://www.celldex.com/pipeline/rindopepimut.php>, Stand 30.01.2017). Da sich in etwa 90 % der rezidierten Tumoren vakzinierter Patienten jedoch keine EGFRvIII-exprimierenden Tumorzellen mehr nachweisen ließen, weist dies auf die hohe Effektivität zielgerichteter Immuntherapien hin (Sampson *et al.*, 2011). Die erfolgreiche Eliminierung des Tumors durch die EGFRvIII-Vakzine scheitert letztlich jedoch an der Heterogenität der Tumorzellen, da ausschließlich EGFRvIII-positive Zellen adressiert werden.

Im Gegensatz dazu handelt es sich bei Tumor-assoziierten Antigenen (TAAs) um nicht mutierte Proteine, welche sich sowohl auf Tumorzellen als auch auf gesunden Zellen (*self-antigens*) finden lassen (Reardon *et al.*, 2014). Trotz der hohen Antigendichte lösen TAAs allerdings eine vergleichsweise eher geringe Immunantwort aus. Grund dafür sind unter anderem posttranslationale Proteinmodifikationen sowie die Immuntoleranz, durch die viele TAAs häufig als körpereigene bzw. ubiquitinierte Proteine erkannt werden und somit nicht zu einer T-Zell-vermittelten Immunantwort führen (Parmiani *et al.*, 2002; Schietinger *et al.*, 2008). Trotz dieser Limitierungen wächst die Liste an immunogenen TAAs, welche als synthetische „*off-the-shelf*“-Antigene im Rahmen von Immuntherapien eingesetzt werden können, stetig an. Die Immunogenität der Antigene bzw. der Nachweis endogener T-Zell-vermittelter Immunantworten gegen ein entsprechendes TAA wurde erst kürzlich in einem Pilotprojekt vom *National Cancer Institute* als eine der wichtigsten Eigenschaften einer „idealen“ Zielstruktur für Tumor-spezifische Impfstoffe definiert (Cheever *et al.*, 2009).

Bisherige Ansätze zur Identifizierung von Gliom-assoziierten Antigenen untersuchten ausschließlich GBM-Tumoren unter der Verwendung von „indirekten“ Methoden wie beispielsweise mRNA-Expressionsanalysen (Okada *et al.*, 2011) oder komplementäre DNA-Bibliotheken (Liau *et al.*, 2000). Die genannten Methoden sowie die Verwendung immunogener TAAs, welche in anderen Tumorentitäten identifiziert wurden, repräsentieren jedoch einen voreingenommenen Auswahlprozess. Im Gegensatz dazu sind „direkte“ Methoden wie die MHC-Liganden-Analyse (Dutoit *et al.*, 2012) oder die in-silico-Vorhersage bei „*Reverse-Immunology*“-Ansätzen (Rammensee *et al.*, 1999) besser geeignet, um maßgeblich TAAs zu identifizieren.

Beispiele für TAAs, die bereits für eine Immuntherapie bei Gliomen untersucht wurden, sind unter anderem IL13R α 2 (Brown *et al.*, 2012), EphA2 (Chow *et al.*, 2012) oder Her2 (Ahmed *et al.*, 2010) oder die Kombination aus IL13R α 2 und Her2 (Hegde *et al.*, 2013). T-Zell-Zielstrukturen, die bereits Anwendung in Peptid-Vakzinen bei Gliomen gefunden haben, sind zum Beispiel IL13R α 2, HER2, gp100, TRP2, EphA2, YKL-40, gp100, Survivin, WT1, SOX2, SOX11, MAGE-A1, MAGE-A3, AIM2 und SART1 (Zhang *et al.*, 2007; Okada *et al.*, 2011, 2015).

Durch die Kombination von einzelnen TAAs in therapeutischen Impfstoffen erhöht sich die Anzahl po-

tenzieller T-Zell-Zielstrukturen was die Chancen eines Therapieerfolges verbessern soll. Dies ermöglicht ebenfalls eine individualisierte Anpassung der Impfstoffe an den Patienten was am Beispiel der GAPVAC-Studie (NCT02149225, Phase I) derzeit untersucht wird. Erste klinische Studien deuten auf die Effektivität (IMA950, Phase I) sowie den verbesserten Krankheitsverlauf bzw. ein längeres Überleben der Gliom-Patienten hin, welche eine kombinierte Peptid-Impfung erhalten haben (Okada *et al.*, 2011; Phuphanich *et al.*, 2013). Eine zusätzliche Steigerung der Effektivität durch konzeptionelle Kombinatorik, wie bereits in anderen Tumorentitäten beschrieben, ist bisher bei Gliomen noch nicht bekannt. Ziel der Kombination einzelner Immuntherapien ist es, verschiedene „*immunoediting*“-Mechanismen gleichzeitig zu adressieren und dadurch ein Entfliehen (*escape*) des Tumors durch die Überwachung des Immunsystems zu verhindern. Momentan wird daher beispielsweise der Einsatz verschiedenster Kombinationen aus Tumor-Antigenen und immunstimulatorischen Zytokinen (Melanom, NCT00019682, Phase III) (Schwartzentruber *et al.*, 2011) oder auch der gleichzeitige Einsatz von mehreren Immun-Checkpoint-Inhibitoren bei Darm- und Eierstockkrebs-Modellen untersucht (Duraiswamy *et al.*, 2013). Darrell J. Irvine (MIT, Cambridge, USA) präsentierte kürzlich unveröffentlichte Ergebnisse aus einem Melanom-Mausmodell einer Vier-Komponenten-Vakzine nach dem AIPV-Prinzip (A= monoklonale Antikörper; I= IL-2; P= α -PD1; V= Tumor-spezifische Impfstoffe), die eine Weiterentwicklung vorheriger Arbeiten ist (Zhu *et al.*, 2015) und eine deutliche Effektivitätssteigerung gegenüber einer Monotherapie darstellt (Pauthner *et al.*, 2016).

1.5 Zielsetzungen dieser Arbeit

Punktmutationen im IDH-Gen sowie deren epigenetischen Auswirkungen (G-CIMP), sind eine charakteristische Eigenschaft der langsam aber stetig wachsenden LGGs und haben sich als zuverlässiger prognostischer Marker für eine weniger aggressive Tumorbiologie dargestellt (Noushmehr *et al.*, 2010; Brat *et al.*, 2015). Obwohl IDH^{mut} LGGs im direkten Vergleich zu IDH^{wt} Gliomen auch ein deutlich besseres durchschnittliches Überleben aufweisen, verbleiben sie eine unheilbare Tumorerkrankung (Brat *et al.*, 2015). Dies ist unter anderem auf das infiltrative Wachstum der Tumore zurückzuführen, wodurch eine totale Resektion des Tumors nahezu unmöglich ist und es durch verbleibende Tumorzellen häufig zur Rezidivierung mit gleichbleibender bzw. ansteigender Malignität kommt (Grier und Batchelor, 2006; Brat *et al.*, 2015). Um verstreute Tumorzellen im Hirnparenchym spezifisch therapieren zu können, bietet besonders die Immuntherapie, durch ihre Vielfalt an Zielstrukturen bzw. Wirkmechanismen, eine Vielzahl erfolgversprechender Ansätze (Galluzzi *et al.*, 2014). Während sich die bisherigen Arbeiten zur Identifizierung neuer T-Zell-Zielstrukturen in Gliomen meist ausschließlich auf GBMs fokussierten (Hatanoto *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Dutoit *et al.*, 2012), gibt es bis heute nur sehr wenige Arbeiten, die das Proteom bzw. das Immunproteom von LGGs untersucht haben (Beckhove *et al.*, 2010; Kalinina *et al.*, 2011; Schumacher *et al.*, 2014). Das zunehmende Wissen über die Biologie, die molekularen Charakteristika sowie den klinischen Verlauf verdeutlicht jedoch die Heterogenität der Gliome und weist auf die Notwendigkeit einer gesonderten Betrachtung der IDH^{mut} LGGs hin.

Aus diesem Grund bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit in der Identifizierung und Charakterisierung von neuen und immunogenen IDH^{mut} LGG-Antigenen, welche als Zielstrukturen für die Entwicklung von T-Zell-basierten Immuntherapien eingesetzt werden können.

- Bestimmung immunogener Zielstrukturen durch systematische Reduzierung der Komplexität von vier IDH^{mut} LGG-Tumorlysaten mittels zweidimensionaler Proteinfractionierung (PF2D) in Kombination mit dem IFN- γ ELISpot Assay und massenspektrometrischen Analysen
- *In silico*-Prädiktion von synthetischen MHC-I-Peptidsequenzen, die anschließend im Bezug auf ihre Patienten-spezifische Immunogenität untersucht werden
- Validierung von Tumor-spezifischen T-Zellantworten durch Überprüfung der Immunogenität in einem unabhängigen IDH^{mut} LGG-Patientenkollektiv sowie in gesunden Probanden
- Eignungsbestimmung potentieller Zielstrukturen für die Verwendung in T-Zell-basierten Immuntherapien basierend auf onkogenen Eigenschaften, einer Tumor-spezifischen mRNA- und Proteinexpression sowie einer Expression auf Tumorstammzellen
- *In silico*-Prädiktion und Validierung reaktiver Epitope von immunogenen Zielstrukturen sowie Quantifizierung Antigen-spezifischer peripherer T-Zellen von IDH^{mut} LGG Patienten

2 Material

2.1 Software

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Software

Produktbezeichnung	Hersteller
CellSens Software	Olympus, Hamburg
FACSDiva Software 6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg
Gold	Beckman Coulter, Krefeld
Graphpad Prism 5.0	Graphpad Prism Software, La Jolla, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmond, USA
Papers 3.4.5	Labtiva, Cambridge, USA
Pixelmator 3.5.1	Pixelmator Team, Vilnius, LIT
ProteoVue	Eprogen, Downers Grove, USA
R Software	The R Foundation for Computing, Wien, AUT
Rstudio	Rstudio, Boston, USA
Texmaker	Free Software Foundation, Boston, USA

2.2 Datenbanken

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Datenbanken

Datenbank	Internetadresse
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast
David Bioinformatics	https://david.ncifcrf.gov
GeneCards - Human Gene Database	http://www.genecards.org
Immune Epitope Database and Analysis Resource	http://www.iedb.org
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Rembrand	http://www.betastasis.com/glioma/rembrandt
The Cancer Genome Atlas	http://www.cancergenome.nih.gov
The Human Protein Atlas	http://www.proteinatlas.org
UniProt	http://www.uniprot.org

2.3 Geräte

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Akku-betriebene Pipettierhilfe	Hirschmann, Eberstadt
BD FACS Aria II	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS Canto	BD Biosciences, Heidelberg
Brutschrank/Inkubator	Sanyo, Wiesloch
Cryostat Leica CM1850 UV	Leica Biosystems, Wetzlar
CTL Analyzer	Cellular Technology Ltd., Cleveland, USA
Einfrierbox Cryo-Safe	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Gefrier- und Kühlkombination (4/-20°C)	Liebherr, Biberach
Gefrierschrank (-80°C)	Sanyo, Wiesloch
Heating Table	Medax, Kiel
Inkubator HERA Cell 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kamera Olympus SC30	Olympus, Hamburg
Kamera Olympus XM10	Olympus, Hamburg
LightCycler 480 II	Roche, Basel, CH
MACSmix Tube Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnet	Invitrogen, Waltham, USA
Magnetsystem Dynal MPC-L	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnetsystem QuadroMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mikroskop Olympus BX50	Olympus, Hamburg
Mikroskop Olympus CKX41	Olympus, Hamburg
Mikroskop Olympus CX31	Olympus, Hamburg
Minifuge	Hettich, Tuttlingen
Multifuge X3FR Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH-Messgerät	EDT Instruments, Dover, UK
Pipetten (1-10 µL, 10-200 µL, 100-1000 µL)	Eppendorf, Hamburg
Power Supply Unit U-RFL-T	Olympus, Hamburg
ProteomeLab PF2D System	Beckman Coulter, Krefeld
SpeedVac-Zentrifuge BA-VC-300H	Bachofer, Reutlingen
Sterilwerkbank	Kojair, Nättraby, FI
Stickstofftank MVE Cryosystem 6000	Chart Industry, Georgia, USA
Tecan Infinite 200	Tecan, Männedorf, CH
TissueLyser II	Qiagen, Valencia, USA
Ultra-Turrax DIAX 900	Heidolph Instruments, Schwabach
Vortex-Mixer	VELP Scientifica, Usmate, IT
Wasserbad	Medingen Labortechnik, Arnsdorf
Zellzähler TC20	BioRad, Hercules, USA
Zentrifuge Sigma Type 1-14	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Zentrifuge Z383K	Hermle, Wehingen
Zentrifuge Z216MK	Hermle, Wehingen

2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
6-, 12-, 24-, 96-Well-Platten, behandelt	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
6-, 12-, 24-, 96-Well-Platten, unbehandelt	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
96-Well-ELISpot Platten (0,45 µm Membran)	Merck Millipore, Darmstadt
96-Well-Platte (2,2 mL Flachboden)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
96-Well-Platten (1,2 mL Rundboden)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Adhäsions-Glasobjektträger HistoBond	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Amicon Ultra (4 mL)	Merck Millipore, Darmstadt
Cover Slip	Knittel Gläser, Braunschweig
CytoClip slide clips	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DAKO-Stift	Dako, Hamburg
DL10, DL200, DL1000 Diamond Tipack	Gilson, Middleton, USA
Eindeckmedium Cytoseal 60	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einweg Zählkammer	BioRad, Hercules, USA
Eppendorf Tubes (0,5 mL, 1,0 mL, 2,0 mL)	Eppendorf, Hamburg
FACS Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon Röhrchen (15 mL und 50 mL)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT
Folie 96-Well-Platte	Flexicom, Halle
Glaswaren	Schott, Mainz
Glas Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
High Pressure Chromatofocussing (HPCF) Säule	Eprogen, Downers Grove, USA
Humidified closed chamber	Carl Roth, Karlsruhe
Kryo Röhrchen	Nalgene, Rochester, USA
Kryo Schneidmesser	Leica Microsystems, Wetzlar
Leucosep Röhrchen (mit poröser Trennschicht)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT
MACS Separation Column MS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MiniMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
No-Porous C18 RP column	Beckman Coulter, Krefeld
Paper Filter Cards	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PD-10 Sephadex Desalting Column	Eprogen, Downers Grove, USA
Pipette (5, 10, 25 mL)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspritzen (5, 10, 20, 50 mL)	BD Biosciences, Heidelberg
Pre-Separation Filters	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Protein LoBind Tubes (1,5 mL)	Eppendorf, Heidelberg
Reusable sample chamber	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Skalpell	Feather, OSAKA, JPN
Slide rack	Carl Roth, Karlsruhe
Spritzen (5mL und 50 mL)	B. Braun, Melsung
Spritzen Filter (0,22 µm)	Merck Millipore, Darmstadt
Stripetten (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Tissue-Tek O.C.T.TM	Sakura, Alphen aan den Rijn, NLD
Zellkulturflaschen (T25, T75, T175)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschale (100 x 20 mm), behandelt	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Zellkulturschale (100 x 20 mm), unbehandelt	Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT
Zellsieb (40 µm, 100 µm)	BD Biosciences, Heidelberg

2.5 Chemikalien

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Produktbezeichnung	Hersteller
Aceton ($\geq 99,5$ %)	Carl Roth, Karlsruhe
Acetonitril (HPLC-Grade)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aqua ad iniectabilia Braun	B. Braun, Melsungen
Caprylyl sulfobetaine (SB3-10)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloralhydrat ($\geq 99,5$ %)	Carl Roth, Karlsruhe
Citronensäure-Monohydrat ($\geq 99,5$ %)	Carl Roth, Karlsruhe
DAKO-Verdünnungslösung	DAKO, Hamburg
Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Merck Millipore, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (1 %)	Biochrom, Berlin
EDTA (Pulver)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Eosin G	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure (100 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol (99,9 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin (86 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Carl Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth, Karlsruhe
HPLC-Wasser (HPLC-Grade)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol (HPLC-Grade)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Luminol Enhancer	GE Healthcare, Amersham, UK
Methanol (HPLC-Grade)	Carl Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Merck Millipore, Darmstadt
Mowiol 4-88	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumjodat	Carl Roth, Karlsruhe
Octyl β -D-Glucopyranosid	AppliChem, Darmstadt
Pacific Orange (PO)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd (PFA) (Pulver)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Peroxidase	GE Healthcare, Amersham, UK
pH-Lösungen (pH 4,0; pH 7,5; pH 10,0)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphate Buffered Saline (PBS) (Pulver)	Biochrom, Berlin
Potassium aluminium sulphate dodecahydrate	Carl Roth, Karlsruhe
Propidiumiodide (PI)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sodium iodate (≥ 99 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Thioharnstoff	Carl Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Trypanblau (0,4 %)	BioRad, Hercules, USA
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Xylene (100 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Merck Millipore, Darmstadt

2.6 Puffer, Medien und Medienzusätze

Tabelle 7: Auflistung von Medien, Puffern und Zusätzen

Produktbezeichnung	Hersteller
1x Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (DPBS)	Invitrogen, Waltham, USA
AB Serum, Human	Milan Analytia, Rheinfelden, CH
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	Novoprotein, Summit, USA
Benzonase	Speed Biosystem, Gaithersburg, USA
Bicoll Separating Solution	Biochrom, Berlin
BIT Admixture - 100	PELOBiotech, Planegg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Development Buffer (25x)	BioRad, Hercules, USA
DNase I	Roche, Basel, CH
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen, Waltham, USA
Einfriermedium (Synth-a-Freeze)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Epidermal Growth Factor (EGF)	Novoprotein, Summit, USA
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FKS)	Merck Millipore, Darmstadt
GlutaMAX	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Biochrom, Berlin
IL-2	Novartis, Basel, CH
IL-4	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Kollagenase Typ I (0,25 %)	Stemcell Technologies, Vancouver, CAN
Liberase DH Research Grade	Roche, Basel, CH
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen, Waltham, USA
PF2D Start-Puffer	Eprogen, Downers Grove, USA
PF2D Elutions-Puffer	Eprogen, Downers Grove, USA
rHu GM-CSF	Sanofi, Frankfurt
RPMI-1640-Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Invitrogen, Waltham, USA
X-Vivo 20	Lonza, Basel, CH

Tabelle 8: Zusammensetzung von Medien und Puffern für die Zellkultur

Puffer und Medium	Zusammensetzung
Auftaumedium (PBMCs)	30 mL X-Vivo 20 10 % AB-Serum (steril filtriert) 1 µL Benzonase
DMEM-Medium	500 mL DMEM 5 mL Fötale Kälberserum 5 mL Penicillin/ Streptomycin
DC-Medium (Dendritische Zellen)	50 mL X-Vivo 20 1000 U/mL IL-4 500 U/mL GM-CSF
Einfriermedium (PBMCs)	90 % AB-Serum 10 % DMSO
Elvanol	74 mL DPBS (pH 8,9) 20 g Mowiol 4-88 (16 Stunden bei 50°C rühren) 46 mL Glycerin 86 % (16 Stunden bei 50°C rühren)
Enzymlösung (≤ 4 g Tumorgewebe)	9 mL HBSS 500 µL Kollagenase 200 µL DNase I
Erythrozyten-Lysepuffer	4,15 g NH ₄ Cl 0,5 g KHCO ₃ 0,0186 g EDTA 500 mL Aqua Braun (pH 7,3)
FACS-Puffer	0,5 % BSA 2 mM EDTA ad 500 mL DPBS
MACS-Puffer	0,2 % FKS 2 mM EDTA ad 500 mL DPBS
PBS/PFA-Puffer	50 mL DPBS 5 mL 4 % PFA
TSZ-Medium (Tumorstammzellen)	500 mL DMEM 1 % Penicillin/ Streptomycin 1 % GlutaMAX 20 % BIT-Medium Admixture 100 0,02 % bFGF (100 µg/mL) 0,02 % EGF (100 µg/mL)
T-Zell-Expandierungsmedium	50 mL X-Vivo 20 10 % AB-Serum 6000 U/mL IL-2
TC-Medium (T-Zellen)	50 mL X-Vivo 20 100 U/mL IL-2 120 U/mL IL-4

Tabelle 9: Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
0,08 % TFA-Puffer	99,92 % Acetonitril 0,08 % TFA
0,1 % TFA-Puffer	99,9 % HPLC-Wasser 0,1 % TFA
Elvanol	74 mL DPBS (pH 8,0 mit 2 M Na ₂ HPO ₄) 20 g Mowiol 4-88 46 mL Glycerin (86 %)
Eosin-Lösung	495 mL Ethanol (70 %) 5 mL Eosin G
Hämatoxylin-Lösung	2 g Hämatoxylin 0,4 g NaIO ₃ 100 g KAl(SO ₄) ₂ 100 g C ₂ H ₃ Cl ₃ O ₂ 2 g C ₆ H ₈ O ₇ ad 2000 mL Aqua Bidest.
Membran-Lysepuffer (PF2D)	5 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 10 % Glycerol 50 mM Tris-HCL (pH 8) 2 % n-Octyl-β-D-Glycopyranosid 2,5 % SB3-10 1 mM Protease-Inhibitor
Neutralisierungspuffer (PF2D)	0,4 M Ammoniumhydrogencarbonat ad 200 mL Aqua Bidest.
PBS (10x)	95,5 g PBS ad 1000 mL Aqua Bidest.
PBS-T (PBS-Tween 20)	500 mL 1x DPBS 0,25 mL Tween 20
Salzhaltiger Waschpuffer (PF2D)	1 M Natriumchlorid 0,2 % n-Octyl-β-D-Glucopyranosid ad 200 mL Aqua Bidest.
Waschpuffer (IHC)	500 mL 1x PBS 0,25 mL Tween 20

2.7 Kits und Beads

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Kits und Beads

Produktbezeichnung	Hersteller
AP Conjugate Substrate Kit	BioRad, Hercules, USA
AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit	Qiagen, Valencia, USA
BCA Protein Assay Kit (Pierce)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CD3 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Cell Enrichment and Detection Kit (IFN- γ -FITC)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Cell Enrichment and Detection Kit (TNF- α -APC)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Cell Enrichment and Detection Kit (IL-2-PE)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Cytometer Setup Tracking Beads	BD Biosciences, Heidelberg
Dynabeads Pan Mouse IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Inside Stain Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
The Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Vectastain Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2.8 Antikörper

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Primärantikörper (anti-human)

Spezifität	Spezies	Klon	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
CFL1	Kaninchen	polyklonal	IgG	1:200	GeneTex, Irvine, USA #GTX102156
CNTN1	Kaninchen	polyklonal	IgG	1:500	Antikörper-online, Aachen #ABIN571818
CRKII	Kaninchen	polyklonal	IgG	1:200	Abnova, Heidelberg #09110WU1z
NME2	Kaninchen	polyklonal	IgG	1:200	Novousbio, Littleton, USA #NBP2-19553
TKT	Maus	5H3	IgG1	1:200	LS-Bio, Seattle, USA #LS-C114955

Tabelle 12: Auflistung der verwendeten Isotypkontrollen (anti-human)

Spezifität	Spezies	Klon	Verdünnung	Hersteller
IgG1	Maus	ICIGG1	1:200	Abcam, Cambridge, UK #ab91353
IgG	Kaninchen	polyklonal	1:200	Sigma-Aldrich, Taufkirchen #I5006

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten PE-konjugierten Sekundärantikörper

Spezifität	Bezeichnung	Isotyp	Verdünnung	Hersteller
Maus	AffiniPureF(ab') ₂ Fragment	IgG	1:100	Jackson, West Grove, USA #115-116-146
Kaninchen	AffiniPureF(ab') ₂ Fragment	IgG	1:100	Jackson, West Grove, USA #115-116-144

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Antikörper (Spezies: Maus, Spezifität: anti-human) für den IFN- γ ELISpot Assay

Spezifität	Klon	Verdünnung	Einsatz	Hersteller
IFN- γ	1-D1K	1:100	ELISpot Entwicklung	Mabtech, Stockholm, SWE #3420-3-10000
IFN- γ	7-B6-1-Biotin	1:100	ELISpot Entwicklung	Mabtech, Stockholm, SWE #3420-6-10000
CD3	polyklonal	1:5	Aufreinigung von dendritischen Zellen	DKFZ, Heidelberg #Dr. G. Moldenhauer
CD19	polyklonal	1:25	Aufreinigung von dendritischen Zellen	DKFZ, Heidelberg #Dr. G. Moldenhauer
CD56	C218	1:25	Aufreinigung von dendritischen Zellen	Beckman Coulter, Krefeld #IM1844

Tabelle 15: Auflistung der verwendeten FACS-Antikörper (Spezies: Maus, Spezifität: anti-human) für den Zytokin-Sekretions-Assay sowie dem Nachweis von phänotypischen und funktionellen Veränderungen in T-Zellen

Spezifität	Konjugiert	Klone	Verdünnung	Hersteller
CD3	PE-Cy7	SK7	1:20	BD Biosciences, Heidelberg #557851
CD4	PerCPC5.5	L200	1:25	BD Biosciences, Heidelberg #552838
CD8	V450	RPA-T8	1:20	BD Biosciences, Heidelberg #560347
CD62L	APC-Cy7	DREG-56	1:10	BioLegend, San Diego, USA #304814
CD45Ra	PE-Cy7	5H9	1:10	BD Biosciences, Heidelberg #561216
CD3	AF700	OKT3	1:10	Biolegend, San Diego, USA # 317340
CD8	AF488	RPA-T8	1:10	Biolegend, San Diego, USA #301021
CD25	PerCP-eFluor710	4E3	1:10	eBioscience, San Diego, USA #46025742
CD69	PE	FN50	1:10	Biolegend, San Diego, USA #310906
CD152	BV	BNI3	1:10	Biolegend, San Diego, USA # 369606
CD279	APC	EH12.2H7	1:10	Biolegend, San Diego, USA #329902

2.9 Peptide

Tabelle 16: Auflistung der synthetisch hergestellten langen Peptide

Protein ID	Länge [AS]	Peptidsequenz
AIP	50	RARGKPMELIIGKKFKLPVWETIVCTMREGEIAQFLCDIKHVVLVPLVAK
ANXA1	51	GTDVNVFNTILTTRSYPQLRRVFQKYTKYSKHMNKVLDLELKGDIKCL
ANXA2	54	MSTVHEILCKLSLEGDHSTPPSAYGSVKAYTNFDAERDALNIETAIKTKGVDEV
ARHGDI	50	SLRKYKEALLGRVAVSADPNVNVVVTGLTLVCSSAPGPLELDLTGDLES
BAG3	50	YPQLRPGYIPIVLHEGAENRQVHPFHVYPQPGMQRFRTEAAAAAPQRSQ
BCAN	52	LTIPCHVHYLRPPPSRRRAVLGSPRVKWTFLSRGREAEVLVARGVRVKVNEAY
BIN1	50	KAQKVFEEMNVDLQEELPSLWNSRVGFVNTFQSIAGLEENFHKEMSKLN
BLMH	49	VMMEEIFRVVICLGNPPETFTWEYRDKDKNYQKIGPITPLEFYREHVK
CA1	50	TLLPSSLDFTYPGSLTHPPLYESVTWIICKESISVSSEQLAQFRSLLSN
CAPZAZ2	49	VRIAAKFIIHAPPGEFNEFNDVRLLLNNDNLLREGAAHAFAYNLDQF
CCDC50	50	ATRAYADSYIEDGGMKPRVMKEAVSTPSRMAHRDQEWYDAEIARKLQEE
CFL1	50	TPEPKGPGDGAEEDEAASGGPGGRGPWSCENFNPLLAVAGGVAVAAIALIL
CNDP2	50	SVHEAMTDLILLMGLSLVDKRGNILIPGINEAVAAVTEEEHKLDDIDFDI
CNTN1	50	RATSVALTWSRGSNDHSPISKYTIQTKTILSDDWKDAKTDPPPIEGNMEA
CRKI	54	DSEERSSWYWGRLSRQEAVALLQGQRHGVFLVRDSSTSPGDYVLSVSENSRVSY
CRKII	53	LGGPEPGPYAQPSVNTPLPNLQNGPIYARVIQKRVPNAYDKTALALEVGELVK
CRYAB	50	FGEHLLSDLFPTSTSLSPFYLRPPSFLRAPSWFDTGLSEMRLEKDRFSV
CST3	50	GVRRALDFAVGEYNKASNDMYHSRALQVVRARKQIVAGVNYFLDVELGRT
CTSB	30	FLGGPKPPQRMFTEDLKLPAFDAREQWP
CTTN	54	GFGGKFGVQMDRVDQSAVGFYQKTEKHASQKDYSSGFGGKYGVQADRVDKSA
DDAH1	50	ASAASSTSSPKAEDGATPSPSNETPKKKKKRFSFKKSKFLSGFSFKKKNK
DDT	50	RLCAAASILGKPADRVNVTVRPGLAMALSGSTEPCAQLSISISIGVVGTA
DPSYL3	51	KGVNSFMVYMAKDYQVSNTELYEIFTCLGELGAIQVHAENGDIIAEQE
DSG1	50	EAMQSLQLSIGVRNKAEFHHSIMSQYKLGASISVTLNVIIEGPFVFRPGS
DTNA	50	CGGKIMDKLRYIFSMISDSSGVMVYGRYDQFLREVLLKPTAVFEGPSFGY
ECHS1	50	FQDCYSSKFLKHWDHLLTQVKKPVIAAVNGYAFGGGCELAMMCDIYAGEK
EEF2	51	KMVPTSDKGRFYAFGRVFSGLVSTGLKVRIMGPNYTPGKKEDLYLKPIQRT
EPB41L2	50	QLRNLPLWFTFNVKFYPPDPSQLTEDITRYFLCLQLRQDIASGRPLPCSFV
EZR	51	FNDKKFVIKPIDKKAPDFVFYAPRLRINKRILQLCMGNHELYMRRRKPDIT
FH	50	YVQQVKYAMTRIKAAMPRIYELAAGGTAVGTGLNTRIGFAEKVAAKVAAL
FSCN1	51	RHDGRLVARPEPATGYTLEFRSGKVAFRDCEGRYLAPSGPSGTLKAGKATK
GMFB	50	RFIVYSYKYQHDDGRVSYPLCFIFSSPVGCKPEQQMMYAGSKNKLVTAE
GRB2	50	VLRDGAGKYFLWVVKFNSLNELVDYHRSTSFSRNQQIFLRDIEQVPQQPT
HLIM	50	RPGTVALREIRRYQKSTELLIRKLPFQRLVREIAQDFKTDLRFQSSAVMA
HSPA4	50	RLRTACERAKRTLSSSTQASLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFR
HSPA5	50	FSETLRAKFEELNMDLFRSTMKPVQKVLESDLKKSIDEIVLVGGSTR
HSPB1	51	LLRGPSWDPFRDWYPHSRLFDQAFGLPRLPEEWSQWLGGSSWPGYVRPLPP
IGFBP2	50	ARMPCAELVREPGCGCCSVCARLEGEACGVYTPRCGQGLRCYPHPSGSELP
INA	50	LEGEETRFSTSGLSISGLNPLPNPSYLLPPRILSATTSKVSSTGLSLKKE
KHSRP	50	TVQEIMIPAGKAGLVIGKGETIKQLQERAGVKMILIQDGSQNTNVDKPL
LDHB	51	ALVDVLEDKLGEMMDLQHGSLFLQTPKIVADKDYSVTANSKIVVVTAGVR
LGALS1	51	GTEQREAVFPFQPGSVAEVCITFDQANLTVKLPDGYEFKFPNRLNLEAINY
MAPK1	50	KTQHLSNDHICYFLYQILRGLKYIHSANVLRDLKPSNLLNTTCDLKIC
MARCKS	50	AASAASSTSSPKAEDGATPSPSNETPKKKKKRFSFKKSKFLSGFSFKKKNK
MSN	50	IDKKAPDFVFYAPRLRINKRILALCMGNHELYMRRRKPDITIEVQQMKAQA

Protein ID	Länge [AS]	Peptidsequenz
MTDH	50	WVILVGTGALGLLLLFLLGYGWAAACAGARKKRRSPPRKREAAAAPAAA
NIT2	50	CYDMRFAELAQIYAQRGCQLLVYPGAFNLTTGPAHWELLQRSRAVDNQVY
NME2	50	FLRASEEHLKQHYIDLKDRPFFPGLVKYMNSGPVAMVWEGLNVVKTGRV
OMG	50	HIVDLSNNSLTQILPGTLINLTNLTHLYLHNNKFTFIPDQSFQDLFQLQE
PARK7	50	KMMNGGHYTYSENRVKEDGLILTSRGPSTFEFALAIVEALNGKEVAAQV
PCNP	50	DLPTKPTKISKFGFAIGSQTTKASAIKLGSSPKETVPTLAPKTLV
PEA15	50	SFLESHNKLDKDNLSYIEHIFEISRRPDLLMVVDYRTRVLKISEEDELDT
PKM2	51	IMVARGDLGIEIPAEEKVFLAQKMMIGRCNRAGKPVICATQMLESMIKPRP
PPP1CA	50	GLCLKSREIFLSQPILLELEAPLKICGDIHQYYDLLRLFYGGFPPESN
PRDX1	50	MSSGNAKIGHAPNFKATAVMPDGQFKDISLSDYKGYVVFYPLDFTF
PRDX4	50	VDSQFTHLAWINTPRRQGGGLPIRIPLLSDLTHQISKDYGVYLEDGHTL
PSMD9	50	GQSESQGPRAFPAKVNISISPGSPASIAGLQVDDIVEFGSVNTQNFQSLH
PURA	50	TVDNKRFFFDVGSNKYGVFMRVSEVKPTYRNSITVPYKVVAKFGHTFCKY
RTN1-A	50	QTGIVFGSFLLLLFSLTQFSVVSVVAYLALAALSATISFRIYKSVLQAVQ
RTN1-B	50	LRRFLVQDLVDSLKFAVLMWLLTYVGALFNGLTLLMAVSMFTLPVVY
S100A8	50	VYRDDLKLLLETECPQYIRKKGADVWFKELDINTDGAVNFQEFILVIKM
S100A9	50	MTCKMSQLERNIETIINTFHQYSVKLGHPDTLNQGEFKELVRKDLQNFLK
SBSN	51	EEDRVVQGLHHGVSQAGREAGQFGHDIHTAGQAGKEGDIAVHGVQPGVHE
SEPT11	52	DSYKPIVEYIDAQFEAYLQEELKIKRSLFNYHDTRIHACLYFIAPTGHSLKS
SEPT2	50	NSLFLTDLYPERVIPGAAEKIERTVQIEASTVEIEERGKRLRLTVVDTPG
SERPINB12	49	YTLSIANRLYGEQEFPICQEYLDGVIQFYHTTIESVDFQKNPEKSRQEI
SERPINB3	50	QQIKKVLHFDQVTENTTGKAATYHVDRSGNVHHQFQKLLTEFNKSTDAYE
SERPINB5	50	STEFISSTKRPYAKELETVDKLEETKQINNSIKDLTDGHEFNILAD
SIRPA	50	NTGSNERNIYIVGVVCTLLVALLMAALYLVRIRQKKAQGSTSSTRLHEP
SNRNP70	50	KQGVTEAAEKTKEGVMYVGAATKENVVQSVTSVAEKTKEQANAVSEAVVS
SOD1	50	VADVSIEDSVISLSDGHCIIIGRTLVVHEKADDLGKGGNEESTKTGNAGSR
SPRR2E	50	SYQQQQCKQPCQPPVCPPTKCEPCPPPKCEPCPPPKCPQPCPPQQCQ
STIP1	49	EKELGNDAYKKKDFDTALKHYDKAKELDPTNMTYITNQAAVYFEKGDYN
TF	50	KSCHTAVGRTAGWNIPMGLLYNKINHCRFDEFFSEGCAPGSKKDSLCKL
TKT	50	NPHNDRFVLSKGHAAPILYAVWAEAGFLAEALLNLRKISSDLGHPVVK
TUBB	50	FQLTHSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRIMNTFSVVPSPKVSDTVVEP
VCAN	50	VAQNGNIKIGQDYKGRVSVPTHPHAEVGDASLTVVKLLASDAGLYRCDVMY

Abkürzungen: AS, Aminosäure

Tabelle 17: Auswahl von HLA-A*02:01-restringierten reaktiven Epitopen

Bezeichnung	Anfang	Ende	Länge [AS]	HLA-Allel	Sequenz	Total Score	IC ₅₀ [nM]
RE1 CFL1	97	104	8	A*02:01	FIFWAPES	-2,44	496,93
RE2 CFL1	97	105	9	A*02:01	FIFWAPESA	-0,38	20,26
RE3 CFL1	79	87	9	A*02:01	ALYDATYET	-0,12	8,14
RE4 CNTN1	633	640	8	B*07:02	SPISKYTI	-0,46	74,45
RE5 CNTN1	620	627	8	A*11:01	SVALTWSR	-0,1	67,23
RE6 CNTN1	643	651	9	A*11:01	KTILSDDWK	-1,01	90,07
RE7 CRKII	234	243	10	A*02:01	LQNGPIYARV	-1,27	215,12
RE8 CRKII	256	265	10	A*02:01	ALALEVGELV	-0,53	50,95
RE9 CRKII	233	241	9	A*02:01	NLQNGPIYA	-1,75	436,95
RE10 CRKII	256	264	9	A*02:01	ALALEVGEL	-0,92	486,18
RE11 NME2	68	77	10	A*02:01	YMNSGPVVAM	-0,19	28,99
RE12 NME2	67	85	10	A*02:01	AMVWEGLNVV	-0,05	44,91
RE13 NME2	68	75	8	A*02:01	YMNSGPVV	0,61	8,46
RE14 NME2	68	76	9	A*02:01	YMNSGPVVA	-0,39	40,58
RE15 NME2	77	85	9	A*02:01	MVWEGLNVV	0,7	9,01
RE16 TKT	92	99	10	A*02:01	FLAEAELLNL	1,13	5,14
RE17 TKT	73	82	10	A*02:01	VLSKGHAAPI	-1,18	112,21
RE18 TKT	66	74	9	A*02:01	FLRASEEHL	-0,61	344,36
RE19 TKT	102	110	9	A*02:01	MVWEGLNVV	0,7	9,01

Abkürzungen: AS, Aminosäure; IC₅₀, mittlere inhibitorische Konzentration; nM, Nanomolar

2.10 HLA-A*02 iTAg MHC-Klasse-I-Tetramere

Tabelle 18: Auflistung der verwendeten HLA-A*02 iTAg MHC-Klasse-I-Tetramere

Tetramer	Antigensequenz	HLA-Allel	Konjugiert	Hersteller
Negativkontrolle	ohne Antigen	HLA-A*02:01	PE	MBL, Woburn, USA #T01044
Influenza-M1	GILGFVFTL	HLA-A*02:01	PE	MBL, Woburn, USA #T01011
CRKII	ALALEVGEL	HLA-A*02:01	PE	MBL, Woburn, USA #T02001
NME2	MVWEGLNVV	HLA-A*02:01	PE	MBL, Woburn, USA #T02001
TKT	FLAEAELLNL	HLA-A*02:01	PE	MBL, Woburn, USA #T02001

Abkürzungen: PE, Phycoerythrin

2.11 Biologische Materialien

2.11.1 Tumorgewebe und Patientenkollektive

Ziel des Projektes war es, IDH^{mut} LGG-Tumore (WHO[°]II und WHO[°]III) proteomisch zu untersuchen, um potentielle T-Zell Zielstrukturen zu identifizieren. Die größte Herausforderung beim Zusammenstellen eines Patientenkollektives bestand darin, Patienten auszuwählen, die sich konstant zu Nachuntersuchungen am Uniklinikum Heidelberg befanden und für weitere Blutspenden zur Verfügung standen. Der direkte Umgang mit Patienten sowie die Abnahme von Blutproben oblag den Fach- bzw. Oberärzten der Klinik für Neurochirurgie. In Kooperation mit der verantwortlichen Oberärztin Dr. med. Christine Jungk wurde daher ein IDH^{mut} Patientenkollektiv zusammengestellt, bestehend aus jeweils zwei Patienten die an einem Astrozytom (WHO[°]II) bzw. Oligodendrogliom (WHO[°]III) erkrankt waren (Tabelle 19). Alle Gewebe wurden intraoperativ gewonnen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Des Weiteren wurden zwei IDH^{mut} Patientenkollektive zusammengestellt, die zur Validierung der Immunogenität von möglichen TAAs (Tabelle 20) bzw. der reaktiven Epitope der jeweiligen Antigene eingesetzt wurden (Tabelle 21). Zum Ausschluss von Patienten-unspezifischen T-Zell-vermittelten Immunantworten der TAAs wurde ebenfalls ein Kollektiv aus gesunden Probanden (angepasst an das Patientenalter) zusammengestellt und zur Validierung verwendet (Tabelle 22). Die Tumore wurden anhand genomischer sowie histopathologischer Merkmale durch den Neuropathologen Prof. Dr. med. von Deimling (Abteilung für Neuropathologie, Uniklinikum Heidelberg) klassifiziert. Somit konnte sichergestellt werden, dass für Untersuchungszwecke nur Gewebe mit einem Tumoranteil > 60 % sowie einer erwiesenen IDH-Mutation verwendet wurden. Die Durchführung jeglicher Experimente in dieser Arbeit wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg genehmigt und unterlag der Zustimmung des jeweiligen Patienten durch eine unterzeichnete Einverständniserklärung.

Tabelle 19: Patientenkollektiv zur Identifizierung von Zielstrukturen T-Zell-vermittelter Immunantworten in Patienten mit IDH^{mut} LGGs

NCH ID	Geschlecht	Alter b.D.	Diagnose	WHO [°]	IDH-Status
NCH519a	m	27	Astrozytom	II	mut
NCH1150	w	39	Astrozytom	II	mut
NCH612	m	39	Oligodendrogliom	III	mut
NCH1390	w	48	Oligodendrogliom	III	mut

Abkürzungen: b.D., bei Diagnose; m, männlich; mut, mutiert; w, weiblich

Tabelle 20: Validierungskollektiv zum Nachweis T-Zell-vermittelter Immunantworten durch die Auswahl potentieller TAA-Kandidaten in IDH^{mut} LGG-Patienten

NCH ID	Geschlecht	Alter b.D.	Diagnose	WHO ^o	IDH-Status
NCH519a	m	27	Astrozytom	II	mut
NCH655	w	50	Oligodendrogliom	II	mut
NCH1150	w	39	Astrozytom	II	mut
NCH1267	m	47	Astrozytom	III	mut
NCH1288	w	50	Oligodendrogliom	II	mut
NCH1390	w	48	Oligodendrogliom	III	mut
NCH1868	m	26	Astrozytom	II	mut
NCH1896	m	44	Oligodendrogliom	III	mut
NCH1884	m	40	Astrozytom	II	mut
NCH1891	m	44	Oligodendrogliom	II	mut
NCH2018	w	49	Astrozytom	II	mut
NCH2057	m	56	Astrozytom	III	mut
NCH2061	w	29	Astrozytom	II	mut
NCH2236	m	30	Oligodendrogliom	II	mut
NCH2331	w	54	Oligodendrogliom	II	mut
NCH2539	w	28	Astrozytom	III	mut

Abkürzungen: b.D., bei Diagnose; m, männlich; mut, mutiert; w, weiblich

Tabelle 21: Validierungskollektiv zum Nachweis T-Zell-vermittelter Immunantworten durch reaktive Epitope in IDH^{mut} LGG-Patienten

NCH ID	Geschlecht	Alter	Diagnose	WHO ^o	IDH-Status
NCH519a	m	27	Astrozytom	II	mut
NCH1000	w	32	Oligodendrogliom	II	mut
NCH1247	m	38	Oligodendrogliom	II	mut
NCH2370	m	40	Astrozytom	III	mut
NCH2411	w	28	Astrozytom	II	mut
NCH2531	w	42	Astrozytom	III	mut
NCH3211	m	24	Oligodendrogliom	II	mut
NCH3343	m	29	Astrozytom	III	mut
NCH3387	m	25	Oligodendrogliom	II	mut
NCH3474	w	47	Oligodendrogliom	III	mut
NCH3532	m	58	Astrozytom	II	mut
NCH3534	w	40	Oligodendrogliom	II	mut
NCH3537	m	48	Astrozytom	III	mut
NCH3539	w	56	Oligodendrogliom	III	mut
NCH3625	m	55	Oligodendrogliom	II	mut
NCH3633	w	43	Oligodendrogliom	III	mut
NCH3660	w	35	Oligodendrogliom	III	mut
NCH3737	m	67	Oligodendrogliom	III	mut

Abkürzungen: m, männlich; mut, mutiert; w, weiblich

2.11.2 Validierungskollektiv gesunder Probanden

Tabelle 22: Validierungskollektiv zum Nachweis von Tumor-unabhängigen T-Zell-vermittelten Immunantworten durch reaktive Epitope in gesunden Probanden

Probanden	Geschlecht	Alter
GP1	w	37
GP2	w	33
GP3	w	53
GP4	m	34
GP5	w	28
GP6	w	30
GP7	m	23
GP8	m	35
GP9	w	47
GP10	m	29
GP11	w	34
GP12	m	42
GP13	w	31

Abkürzungen: m, männlich; w, weiblich

2.11.3 Zelllinien

Tabelle 23: Auflistung der verwendeten und authentifizierten IDH^{mut} Gliom-Zelllinien

NCH ID	Diagnose	WHO ^o	IDH-Status	Passage	Authentifizierung
NCH551b	sek. Glioblastom	IV	mut	30	bestätigt
NCH612	Oligodendrogliom	III	mut	34	bestätigt
NCH620	sek. Glioblastom	IV	mut	36	bestätigt
NCH645	sek. Glioblastom	IV	mut	17	bestätigt
NCH1681	Astrozytom	III	mut	22	bestätigt

Abkürzungen: mut, mutiert; sek, sekundäres

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeitsschritte wurden unter aseptischen Bedingungen in einer Sterilwerkbank durchgeführt. Zur Herstellung einer keimfreien Umgebung wurden jegliche Gebrauchsgegenstände vor Benutzung autoklaviert sowie die Arbeitsfläche mit Ethanol desinfiziert. Die Kultivierung von eukaryotischen Zellen erfolgte wie in den jeweiligen Methoden beschrieben. Alle Zellen wurden bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % in einer mit Wasserdampf gesättigten Umgebung gehalten. Die Zellen wurden zwei- bis dreimal pro Woche mit frischem Medium versehen und entsprechend ihrer Zelldichte gesplittet.

3.1.1 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der automatisierte Zellzähler TC20 verwendet. Der Messbereich für die Zellzahlbestimmung von *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) wurde standardmäßig für einen Durchmesser zwischen 5 µm - 15 µm eingestellt. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 10 µL der Probe mit 10 µL Trypanblau verdünnt und in einer Einweg-Zählkammer gemessen. Die Vitalität der Zellen wird hierbei durch das Gerät automatisch errechnet.

3.1.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Die Isolierung von PBMCs erfolgte aus intra- bzw. postoperativ entnommenem heparinisiertem Vollblut mittels Bicol-Dichtegradientenzentrifugation. Zur Separation von Lymphozyten wurden 15 mL Bicol-Trennlösung (Polysucrose, Dichte 1,077 g/mL) in die Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Jeweils 25 mL heparinisiertes Vollblut wurden mit DPBS verdünnt und ebenfalls über die Bicol-Trennlösung geschichtet. Während der Zentrifugation bei 1.400 xg für 20 Minuten ohne Bremse sammelten sich die PBMCs aufgrund ihrer Dichte in der Interphase zwischen der Thrombozyten/Plasma-Lösung und der Bicol-Trennlösung. Die weiße Grenzschicht wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen dreimal in 50 mL DPBS resuspendiert, bei 300 xg für 10 Minuten abzentrifugiert und die Zellzahl bestimmt.

Kryokonservierung von PBMCs Nach erfolgreicher Isolierung der PBMCs wurden die Zellen in einer Zellzahl von 7×10^6 - 2×10^7 Zellen/mL in Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden in einer Einfrierbox verpackt und bei -80 °C für 24 Stunden schonend eingefroren. Zur langfristigen Konservierung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und dort bis zum Gebrauch bei -196 °C gelagert.

Auftauen und Inkulturnahme von PBMCs Um Schäden durch toxische Bestandteile des Einfriermediums (DMSO) zu vermeiden, wurden die kryokonservierten Zellen nach Entnahme aus dem Stickstofftank schnellstmöglich bei 37 °C im Wasserbad angetaut. Anschließend wurde den Zellen tropfenweise 800 μ L Auftaumedium zugeführt, bevor sie zügig in $9,2$ mL Auftaumedium überführt wurden. Die Zellen wurden abzentrifugiert und anschließend in zytokinfreiem X-Vivo 20-Medium weiterkultiviert. Die Zugabe von Benzonase im Auftaumedium degradiert DNA-Bestandteile, die von abgestorbenen Zellen freigesetzt wurden und erhöht dadurch die Ausbeute der lebenden Zellen.

3.1.3 Isolierung und Kultivierung von dendritischen Zellen und T-Zellen

Nach der Isolierung von PBMCs wurden die Zellen für 60 Minuten in einer behandelten Zellkultur-Petrischale mit zytokinfreiem X-Vivo 20-Medium kultiviert. Während dieser Zeit adhärten Monozyten, während Lymphozyten in Suspension verblieben. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, die Platte mit 5 mL X-Vivo 20 gespült und in einem 50 mL Falcon bei 300 xg für 10 Minuten abzentrifugiert. Zu den adhären Zellen wurden 15 mL DC-Medium gegeben, was im Besonderen durch die beigetzten Zytokine dazu führt, dass Monozyten zu dendritischen Zellen differenzieren, ohne sich zu teilen. Die Lymphozyten wurden nach der Zentrifugation in TC-Medium resuspendiert und auf unbehandelten Petrischalen weiterkultiviert. Beide Zellpopulationen wurden für 5-10 Tage entsprechend kultiviert.

3.1.4 Isolierung spezifischer Zellpopulationen aus LGG-Tumorgewebe

Herstellung einer Einzelzellsuspension aus soliden Tumorgeweben Nach operativer Entnahme von Tumorgeweben wurden diese schnellstmöglich aufgearbeitet oder über Nacht bei 4 °C in DMEM-Medium gelagert. Zuerst wurde das Gewicht der Gewebeprouben bestimmt, um die Menge an Enzym für den Enzym-Verdau abschätzen zu können. Die Tumorgewebe wurden unter aseptischen Bedingungen in eine Petrischale überführt und manuell zerkleinert. Hierbei wurden verbrannte Bereiche des Gewebes sowie größere Blutaggregate entfernt. Mit einem Spatel wurden die zerkleinerten Gewebestücke durch ein Sieb passiert, wodurch eine homogene Zellsuspension entstand. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 300 xg und RT abzentrifugiert. Um eine Einzelzellsuspension herzustellen, wurde das Zellpellet in einer Enzymlösung resuspendiert und für 45 Minuten in einer T75 Suspensionskulturflasche (grün) bei 37 °C inkubiert. Der Enzymverdau wurde mit einer Lösung aus 15 mL HBSS und 15 mL EDTA abge-

stoppt. Um weiterhin bestehende Zellaggregate abzureichern, wurde die Einzelzellsuspension zuerst durch einen 100 µm und anschließend durch einen 40 µm Falcon Cell Strainer gefiltert. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert und dreimal in 50 mL DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 4 mL TSZ-Medium resuspendiert, in eine T25 Suspensionskulturflasche (grün) überführt und für eine Stunde bei 37 °C kultiviert. Während der Inkubationszeit setzten sich adhärenente Zellen ab, weshalb der Überstand und die darin enthaltenen T-Zellen sowie GSCs für weitere Isolierungsschritte in ein neues Falcon überführt und abzentrifugiert wurden. Anschließend konnte das Zellpellet zur Isolierung von CD3⁺ T-Zellen oder GSCs verwendet werden.

Isolierung von CD3⁺ TILs Zur Isolierung von CD3⁺ T-Zellen wurde das Pellet vorsichtig in 30 mL einer 15 %-igen Dextranlösung resuspendiert und bei 4.600 xg für 10 Minuten und RT zentrifugiert. Durch den Dextrangradienten erfolgte ein weiterer Aufreinigungsschritt, wodurch das Myelin sowie Zellfragmente als weißer Ring oberhalb der Dextranschicht separiert und anschließend verworfen wurden. Die im Pellet enthaltenen T-Zellen wurden erneut dreimal mit 50 mL DPBS gewaschen, bevor sie durch eine magnetische, CD3-basierte Zellsortierung isoliert wurden. Bei der magnetischen Zellsortierung (*MACS Bead Sort*) werden Zellen mittels positiver Selektion durch einen spezifischen Antikörper an magnetische Mikropartikel gebunden. Dadurch lassen sich die Zellen in der Nähe eines starken Dauermagneten reversibel zurückhalten. Zellen, die nicht an einen magnetischen Mikropartikel gebunden sind, lassen sich durch mehrmaliges Waschen direkt von der Säule eluieren. Durch Entfernen des magnetischen Feldes lassen sich die magnetisch fixierten Zellen eluieren und man erhält ein aufgereinigtes Isolat der Zielzellen. Die Isolierung von Tumor-infiltrierenden CD3⁺ T-Zellen erfolgte über das eben beschriebene Prinzip durch Verwendung von CD3-Mikropartikeln [OKT3] wie vom Hersteller beschrieben. Alle Zentrifugationsschritte wurden für 10 Minuten bei 300 xg und 4 °C durchgeführt. Jeweils 1×10^7 Zellen wurden mit 80 µL FACS-Puffer und 20 µL CD3-Mikropartikel gemischt und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 80 µL FACS-Puffer zugegeben und die Zellen abzentrifugiert. Das Pellet (bis max. 1×10^8 Zellen) wurde in 500 µL FACS-Puffer resuspendiert und über einen Separationsfilter auf eine äquilibrierte Separationssäule (MACS Column MS (1×10^7 gelabelte Zellen) oder LS (1×10^8 gelabelte Zellen)) gegeben. Nach drei Waschschritten mit FACS-Puffer wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und die Zellen in einem Volumen von 1 mL X-Vivo 20-Medium unter Zuhilfenahme des Stempels eluiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen entsprechend ihrer Bestimmung weiterkultiviert.

Isolierung von GSCs Zur Isolierung von GSCs wurde das Pellet vorsichtig in 10 mL eisgekühltem Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Der hypotone Puffer führt zur Hämolyse der Erythrozyten, ohne dabei andere Zellen (GSCs) zu schädigen. Anschließend wurden die Zellen mit DPBS auf 50 mL aufgefüllt und bei 300 xg abzentrifugiert. Das Pellet wurde analog

erneut gewaschen, bevor es in 4 mL TSZ-Medium resuspendiert und in eine T25 Suspensionskulturflasche (grün) überführt wurde. Die Kultivierung der GSC-Sphäroid-Kulturen erfolgte wie folgt beschrieben (siehe Abschnitt 3.1.5).

3.1.5 Kultivierung von Tumorstammzellen

Tumorstammzellen wurden als Sphäroid-Kulturen in TSZ-Medium kultiviert. In frühen Passagen, bei denen GSCs nur sehr kleine Sphäroide bilden und daher kaum sedimentieren, erfolgte der Mediumswechsel durch einen Zentrifugationsschritt bei 300 xg für 5 Minuten. In späteren Passagen erfolgte der Mediumswechsel, indem die Zellkulturflasche für etwa 5 Minuten in senkrechter Position gelagert und dadurch die Zellen sedimentiert wurden. Ein Teil des sphäroidarmen Mediumüberstandes wurde abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Der Überstand wurde jedoch nicht verworfen, sondern bei 300 xg für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 mL frischem TSZ-Medium resuspendiert und der ursprünglichen Kultur zugeführt. Die Tumorstammzellen wurden gesplittet, sobald die Größe der Sphäroide bzw. die Dichte der Kultur zu groß wurde. Dazu wurden die Zellen von der Zellkulturflasche gespült und in einem 50 mL Falcon zur Sedimentation gelagert. Der Überstand wurde maximal abgenommen und die Zellen in etwa 1 mL TSZ-Medium durch vorsichtiges Resuspendieren (15-20 Wiederholungen) mit einer sterilen Glaspipette vereinzelt. Die Zellen wurden ihrer Dichte entsprechend verdünnt und in neuen unbehandelten Zellkulturflaschen weiterkultiviert.

Kryokonservierung von Tumorstammzellen Tumorstammzellen wurden in serumfreiem Synth-a-Freeze Einfriermedium kryokonserviert. Hierfür wurde die Zellsuspension bei 300 xg für 10 Minuten abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit Einfriermedium auf $1,5 - 3,5 \times 10^6$ Zellen/mL verdünnt und in einem Einfrierbehälter bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 24 Stunden schonend eingefroren. Zur langfristigen Konservierung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und dort bis zum Gebrauch bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Auftauen von Tumorstammzellen Eine einzelne Ampulle kryokonservierter Tumorstammzellen wurde im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ kurz erwärmt und in 10 mL vorgewärmtem TSZ-Medium verdünnt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 300 xg für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in TSZ-Medium resuspendiert und in eine unbeschichtete Zellkulturflasche überführt.

Authentifizierung von Tumorstammzellen Zur Sicherstellung der Reinheit isolierter GSCs wurden die Zellen einer Identitätsprüfung unterzogen. Hierfür wurde die genomische DNA der Patienten aus Blut und Tumorgewebe durch die technischen Assistenten des Labors isoliert. Die Authentifizierung erfolgte durch das Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Zur Erstellung eines DNA-Profiles wurden polymorphe DNA-Abschnitte (*Short Tandem Repeats*, STR) analysiert (Masters *et al.*, 2001) und mit der DSMZ-Zelldatenbank abgeglichen.

3.1.6 IFN- γ ELISpot Assay

Der IFN- γ *Enzyme Linked Immunospot* (ELISpot) Assay ermöglicht die Detektion und damit den Nachweis von IFN- γ -sekretierenden T-Zellen auf Einzelzell-Niveau (Abbildung 1). Die Methode ermöglicht es, den sensitiven Prozess einer Antigen-basierenden T-Zell-Immunantwort zu quantifizieren. In diesem autologen Assay wurden dendritische Zellen mit Peptiden beladen und dazu genutzt, T-Zellen zu stimulieren. Wenn die T-Zellen auf den Stimulus reagieren, sezernieren T-Zellen unter anderem das Zytokin IFN- γ , welches mittels monoklonalem „capture“ oder Fängerantikörper nachgewiesen werden kann. Der Antikörper wurde auf die Nitrozellulosemembran einer „Flat-Bottom“ 96-Well Mikrotiterplatte geschichtet, was die anschließende Spot-Detektion ermöglichte. Durch Waschschritte wurden die Zellen sowie das Antigen entfernt, sodass nur die mit Zytokin-beladenen Fängerantikörper zurückblieben. Der Nachweis einer T-Zell-vermittelten IFN- γ -Sekretion erfolgte durch Zugabe eines mit alkalischer

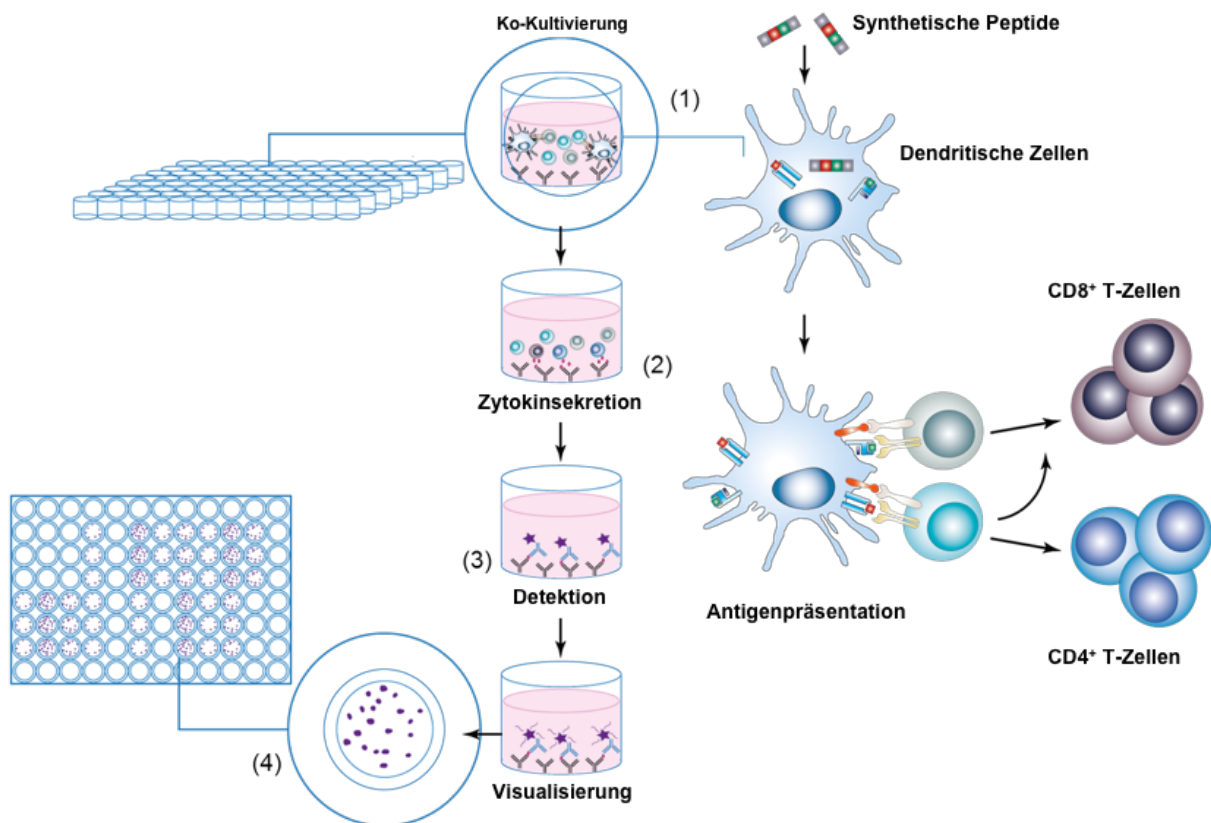


Abbildung 1: Prinzip des IFN- γ ELISpot Assays. Der ELISpot ermöglicht die Quantifizierung von IFN- γ -sekretierenden T-Zellen auf Einzelzell-Niveau. (1) Hierfür wurden T-Zellen mit Antigen-beladenen, dendritischen Zellen kokultiviert, was (2) zur Zytokinsekretion führt. (3) Durch einen auf der Nitrozellulosemembran angebrachten Fängerantikörper wird das sezernierte Zytokin permanent gebunden. (4) Einen durch Alkalische Phosphatase (konjugiert an den Detektionsantikörper) verursachte chromogene Substratumsetzung ermöglicht die Quantifizierung eines optisch sichtbaren Niederschlags. Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Dr. Slava Stamova (Abteilung Translationale Immunologie, DKFZ) zur Verfügung gestellt.

Phosphatase markierten Detektionsantikörpers und dem enzyspezifischen Substrat. Bei positiver Detektion präzipitiert ein chromogenes Reaktionsprodukt, wodurch ein optisch sichtbarer Niederschlag, der sogenannte „Spot“, entsteht. Jeder Spot dient als quantitativer Nachweis einer aktivierten und Zytokinsekretierenden T-Zelle.

Beschichtung der ELISpot-Platten Die 96-Well ELISpot-Platten wurden mit jeweils 100 µL pro Well einer 1:100 Verdünnung (PBS) des *anti-human* IFN- γ mAb (1-D1K, Mabtech) beschichtet und über Nacht bei 4 °C gelagert.

Blockierung von unspezifischen Proteinbindungsstellen Am folgenden Tag wurde die Antikörperlösung entfernt und die 96-Well Mikrotiterplatten zuerst mit PBS-T und PBS gewaschen. Anschließend wurden die Wells mit 100 µL RPMI + 10 % humanem AB-Serum befüllt, für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und erneut gewaschen. Dieser Schritt ist essenziell, da durch die Blockierung von freien Proteinbindungsstellen eine Reduktion des unspezifischen Hintergrundsignals erreicht wird. Als finaler Schritt wurden die Wells mit X-Vivo 20 gespült, bevor sie mit 60 µL des Mediums befüllt und bis zur Verwendung bei 37 °C im Brutschrank gelagert wurden.

Aufreinigung von dendritischen Zellen Dendritische Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, für 5-10 Tage in DC-Medium kultiviert. Anschließend erfolgte ein Mediumswechsel und die Zellen wurden für 24 Stunden in zytokinfreies X-Vivo 20 überführt. Um die Reinheit der dendritischen Zellen für den Einsatz im ELISpot zu erhöhen, wurde eine sogenannte negative Selektion mittels magnetischer Zellsortierung durchgeführt. Sowohl NK-Zellen (CD56), B-Zellen (CD19) als auch T-Zellen (CD3) wurden durch monoklonale Antikörper (*monoclonal Antibodies*, mAb) an magnetische Mikropartikel gebunden und aus der Kultur differenzierter Monozyten abgereichert. Hierfür wurden entsprechend der Herstellerangaben je 300 µL Dynabeads Pan Mouse IgG pro 1×10^7 Zellen mit MACS-Puffer gewaschen und zu drei gleich großen Teilen aufgeteilt. Jedes Drittel wurde mit 20 µL anti-CD56 mAb, 4 µL anti-CD19 oder 4 µL anti-CD3 mAb für 20 Minuten bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Beads gewaschen, in jeweils 100 µL MACS Puffer resuspendiert und zusammengeführt. Die dendritischen Zellen wurden von der Zellkultur-Petrischale gespült, pelletiert und zusammen mit den Antikörper-gekoppelten, magnetischen Mikropartikeln für 20 Minuten bei RT rotierend inkubiert. Die an die Antikörper gebundenen Zellen, wurden in zwei Waschschrritten durch einen Dauermagneten von den dendritischen Zellen separiert. Der Überstand aus beiden Separationsschrritten wurde zentrifugiert und das aus dendritischen Zellen bestehende Pellet auf die entsprechende Zellzahl verdünnt.

Beladung von dendritischen Zellen mit synthetischen Peptiden Das Beladen mit synthetischen Peptiden bzw. das sogenannte „pulsing“ der dendritischen Zellen erfolgte in einer separaten 96-Well

Platte. Hierzu wurden die aufgereinigten dendritischen Zellen auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/mL verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden nun für jedes Peptid jeweils 140 μL in ein Well aliquotiert und mit 7 μL der synthetisch hergestellten Peptide (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Stock-Konzentration) gemischt. Demzufolge wurden 7×10^4 dendritische Zellen mit 7 μg Peptid beladen, gut resuspendiert und mit jeweils 40 μL x-Vivo 20-Medium ($\hat{=}$ 2×10^4 dendritischen Zellen) als Triplikate in die vorbereitete 96-Well ELISpot-Platte aliquotiert.

Aufreinigung von T-Zellen In Anlehnung an die Kultivierung von dendritischen Zellen wurden auch die T-Zellen 24 Stunden vor ihrer Verwendung in ein zytokinfreies X-Vivo 20-Medium überführt. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Waschen von der Petrischale gespült, in ein 15 mL Falcon überführt und bei 1.400 xg für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt und nach Herstellerangaben weiterverarbeitet. Je 1×10^7 Zellen wurden in 80 μL MACS-Puffer und 20 μL Antikörper-Mix resuspendiert und für 20 Minuten bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in jeweils 100 μL MACS-Puffer sowie 100 μL vorbereitete (*pre-washed*) Dynabeads (pro 1×10^7 Zellen) resuspendiert und für 15 Minuten bei RT unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden 5 mL MACS-Puffer hinzugegeben und die Suspension für 2 Minuten auf dem Magneten inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues 15 mL Falcon überführt und erneut für 2 Minuten auf dem Magneten inkubiert. Zuletzt wurde der Überstand abgenommen, mit X-Vivo 20 auf 50 mL aufgefüllt und bei 1.400 xg für 10 Minuten abzentrifugiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/mL eingestellt. Jeweils 100 μL der aufgereinigten T-Zellen (1×10^5 Zellen) wurden nun im Verhältnis 1:5 zu den beladenen dendritischen Zellen (2×10^4 Zellen) gegeben und für 40 Stunden bei 37 °C kokultiviert.

Entwicklung der IFN- γ ELISpot-Platten Nach Ablauf der Inkubationszeit, in der die T-Zellen durch die mit Antigen-beladenen dendritischen Zellen stimuliert wurden, erfolgte im letzten Schritt der kolorimetrische Nachweis der IFN- γ -Sekretion. Die im Folgenden beschriebenen Waschschrte wurden mit den jeweils beschriebenen Waschlösungen durchgeführt und durch kräftiges Ausgießen bzw. anschließendem Ausklopfen der ELISpot-Platte auf Papiertücher abgeschlossen. Hierbei ist es wichtig, die Menge an verbleibenden Flüssigkeiten auf der Nitrozellulosemembran maximal zu reduzieren. Zuerst wurde das Gemisch aus T-Zellen und Antigen-beladenen dendritischen Zellen entfernt und anschließend dreimal mit PBS-T und PBS gewaschen. In jedes Well wurden 200 μL destilliertes Wasser (ddH_2O) pipettiert, um verbleibende Zellen zu lysieren und damit unspezifische Hintergrundfärbungen zu verhindern. Die Wells wurden erneut dreimal mit PBS-T und PBS gewaschen. Je 100 μL des biotinylierten IFN- γ -Antikörpers (Verdünnung: 1:1000) wurden in die Wells pipettiert und für 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut dreimal mit PBS-T und PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden 100 μL des Streptavidin-Alkalin-Phosphate-Komplexes (AP Conjugate Substrate Kit) in jedes Well ge-

geben, für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend wie beschrieben erneut gewaschen. Die im letzten Schritt verwendete Substratlösung wurde wie vom Hersteller beschrieben angesetzt. Hierfür wurden 9,4 mL ddH₂O, 400 µL 25x *Development Buffer* und jeweils 100 µL der *Solution A* und *Solution B* in einem 15 mL Falcon gemischt und sofort im Anschluss verwendet (beide Reagenzien: AP Conjugate Substrate Kit). In jedes Well wurden 100 µL Substratlösung gegeben und für 5-60 Minuten abgedunkelt entwickelt. In regelmäßigen Abständen wurde der Fortschritt der kolorimetrischen Reaktion durch visuelle Überprüfung verfolgt. Nachdem in den Positiv-Kontrollansätzen optisch sichtbare (violette) Niederschläge erkennbar waren, wurde der enzymatische Substratumsatz durch mehrmaliges Waschen mit ddH₂O abgestoppt. Die ELISpot-Platten wurden sorgfältig auf Papiertüchern ausgeklopft und über Nacht getrocknet.

Visualisierung und Auswertung der IFN- γ ELISpot-Platten Die 96-Well ELISpot-Platten wurden mittels CTL-Analyzer visualisiert und analysiert. Jeder Spot repräsentiert hierbei eine IFN- γ -sekretierende T-Zelle. Zur Bestimmung der Immunogenität wurden die Spot-Zahlen des zu analysierenden Peptids mit den Spot-Zahlen der Negativkontrolle (IgG) in biologischen Triplikaten verglichen (Abbildung 2). Eine Peptid-induzierte T-Zell-Immunantwort wurde als positiv erachtet, wenn die Anzahl der IFN- γ -Spots signifikant höher als die der Negativkontrolle war. Zusätzlich wurde die erfolgreiche Durchführung des IFN- γ ELISpot Assays durch die Positivkontrollen (*Staphylococcal Enterotoxin B* (SEB) und Adenovirus (AdV)/Cytomegalovirus (CMV)) überprüft. Die Verwendung des „Superantigens“ SEB ermöglicht es, eine Aussage über die Funktionalität der T-Zellen zu treffen, da dieses in der Lage ist, direkt an den T-Zell-Rezeptor zu binden und ohne Kostimulation eine Immunantwort auszulösen. Zur Gewährleistung einer präzisen Auswertung wurde die Analyse sowie die manuelle Qualitätssicherung ausschließlich von Dr. Slava Stamova (Abteilung für Tumormunologie, DKFZ) durchgeführt.

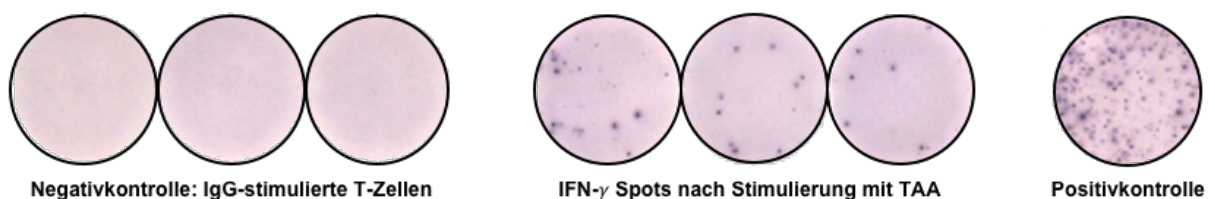


Abbildung 2: Visualisierung der IFN- γ -Spots mittels CTL-Analyzer.

3.1.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt ein präzises Messverfahren dar, um eine große Anzahl von Zellen in Einzelzellsuspension auf unterschiedliche zelluläre Eigenschaften zu untersuchen. Durch das Anbringen von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern lassen sich sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Antigene der Zielzellen analysieren. Der Einsatz unterschiedlicher Fluorochrome ermöglichte die Unter-

suchung von bis zu acht Markern gleichzeitig. Die Messung der Proben als Einfarben- bzw. Mehrfarben-Methode erfolgte am FACSCanto II. Eine FACS-Sortierung bzw. eine Isolierung von markierten Zellen, erfolgte durch Dr. Eckstein am FACS Aria II in der FACS Core Facility (Uniklinikum Heidelberg). Die markierten Zellen wurden in einem dünnen Kapillarsystem vereinzelt und durch einen Laser zur Emission einer spezifischen Wellenlänge angeregt. Durch spezielle Filter wird dieses Licht in Photodetektoren in elektrische Signale umgewandelt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der FACSDiva Software. Als Basiswert wurde die mediane Fluoreszenzintensität ummarkierter Zellen bzw. von Zellen, die mit einem entsprechenden Isotyp-Antikörper gefärbt wurden, verwendet.

3.1.7.1 Expression von Tumor-assoziierten Antigenen in IDH^{mut} LGG-Zelllinien

Die Tumorstammzell-Sphäroide wurden vorsichtig von den Flaschen gespült und in einem 50 mL Falcon sedimentiert. Der sphäroidarme Überstand wurde bis auf etwa 1 mL abgenommen und die Zellen im restlichen Volumen (1 mL) mit einer Glaspipette vereinzelt. Die Einzelzellsuspensionen wurden mit DPBS auf 5 mL aufgefüllt und durch einen 40 µm Cell Strainer filtriert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt. Pro Ansatz wurden jeweils 5×10^5 Zellen verwendet. Die Ansätze wurden zweimal in 10 mL DPBS resuspendiert und anschließend bei 300 xg für 5 Minuten bei 10 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 500 µL FACS-Puffer resuspendiert, auf eine 64-Well-Platte verteilt und darin erneut pelletiert.

Nachweis von extrazellulären Proteinen Das Pellet wurde in 50 µL FACS-Puffer resuspendiert und durch Zugabe des entsprechenden Antikörpers (Verdünnung siehe Tabelle 11) für 10 Minuten bei 4 °C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen dreimal durch Zugabe von 1 mL FACS-Puffer und erneutes Zentrifugieren gewaschen. Die markierten Zellen wurden in 200 µL FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung bei 4 °C oder auf Eis gelagert.

Nachweis von intrazellulären Proteinen Intrazelluläre Proteine sind durch die intakte Zellmembran für Antikörperfärbungen unzugänglich, weshalb zuerst ein Permeabilisierungsschritt durchgeführt werden muss. Hierfür wurden die Zellen in 125 µL FACS-Puffer und 125 µL *Inside Fix* resuspendiert. Die Fixierung wurde für 20 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen bei 300 xg für 5 Minuten bei RT abzentrifugiert und in 1 mL FACS-Puffer gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte durch Zugabe von 100 µL *Inside Perm* für 10 Minuten bei 37 °C. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen mit den entsprechenden Antikörpern gegen intrazelluläre Antigene gefärbt (Verdünnung siehe Tabelle 11). Durch Zugabe von 1 mL FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation wurden die Zellen dreimal gewaschen. Zuletzt wurden 100 µL Sekundärantikörper (siehe Tabelle 13) hinzugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Zellpellet in 200 µL FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Messung bei 4 °C oder Eis gelagert. Um

lebende von toten Zellen zu diskriminieren, wurden die Zellen kurz vor der Messung durch Zugabe von 3 μL Propidiumiodid gefärbt.

3.1.7.2 Zytokin-Sekretions-Assay

Der Zytokin-Sekretions-Assay ist eine quantitative Nachweismethode, die es erlaubt, die Antigen-induzierte Zytokinsekretion von T-Zellen auf Einzelzell-Niveau zu analysieren (Abbildung 3). Hierzu wurden bispezifische Antikörper an die Zelloberfläche von CD3^+ T-Zellen gebunden. Die zweite Spezifität der Antikörper richtet sich gegen ein Zytokin, welches während der Sekretionsphase von der Zelle freigesetzt und unmittelbar an die sezernierende T-Zelle gebunden wurde. Durch Markierung mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper, der ebenfalls gegen das Zytokin gerichtet ist, lassen sich mittels Durchflusszytometrie Zytokin-sekretierende Zellen quantifizieren. Die Analysen wurden als biologische Triplikate durchgeführt. Die Beladung von 2×10^5 dendritischen Zellen/mL erfolgte über einen Zeitraum von 9 Stunden nach Zugabe von 10 μL der entsprechenden Peptide (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Wie bereits für den $\text{IFN-}\gamma$ ELISpot wurde IgG als Negativkontrolle sowie SEB als Positivkontrolle eingesetzt (jeweils 1 μL). Für ein totales Reaktionsvolumen von 1 mL wurden 500 μL der beladenen dendritischen Zellen (2×10^5 Zellen/mL) mit 500 μL autologen T-Zellen (2×10^6 Zellen/mL) gemischt und für 9-12 Stunden kokultiviert. Die Durchführung des Zytokin-Sekretions-Assays erfolgte wie in den Herstellerangaben beschrieben. Kurz zusammengefasst wurden die Zellen mit den bispezifischen Antikörpern gegen die Zytokine $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ und IL-2 aus den jeweiligen *Cell Enrichment and Detection Kits* markiert, die während der Sekretionsphase die entsprechenden Zytokine gleichzeitig auf der Oberfläche der T-Zellen binden sollen. Anschließend wurden die T-Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern, den sogenannten Detektions-Antikörpern (anti- $\text{IFN-}\gamma$ (FITC), anti- $\text{TNF-}\alpha$ (APC) und anti-IL-2 (PE)) der entsprechenden Kits angefärbt (Tabelle 15). Zur genaueren Identifizierung einzelner T-Zell-Populationen wurden

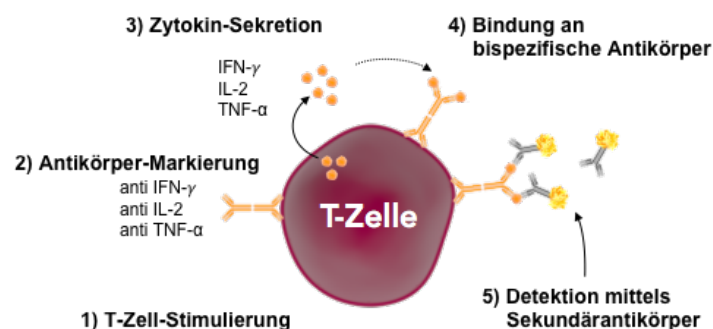


Abbildung 3: Prinzip des Zytokin-Sekretions-Assays. (1) Nach Stimulierung der T-Zellen mit kurzen Peptiden (sog. Antigene) werden (2) bispezifische Antikörper auf der Zelloberfläche der T-Zellen gebunden. (3-4) Diese binden die jeweiligen Zytokine unmittelbar nach Freisetzung an die sezernierende T-Zelle. (5) Durch einen Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper werden Zytokin-positive Zellen markiert und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

die T-Zell-Oberflächenmarker CD3, CD4, CD8, CD62L und CD45RA angefärbt und mittels FACSCanto II analysiert (siehe Tabelle 15).

3.1.7.3 Nachweis von Antigen-spezifischen PBMTc

Kryokonservierte PBMCs wurden aufgetaut und für 24 Stunden in TC-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen bei 1.400 xg für 5 Minuten pelletiert und in MACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/mL eingestellt und je 500 μ L ($2,5 \times 10^6$ Zellen) pro Ansatz in die FACS-Röhrchen aliquotiert. Für den Ansatz der ungefärbten Zellen wurden nur 50 μ L eingesetzt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und in 100 μ L *Blocking*-Puffer für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 50 μ L MACS-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 5 μ L des entsprechenden MHC-Tetramers, 3 μ L anti-CD8 AF488 und 5 μ L anti-CD3 AF700 gefärbt. Die Zellen wurden hierfür 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 3 mL MACS-Puffer hinzugegeben und die Zellen erneut für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 μ L DPBS/PFA-Puffer resuspendiert und für mindestens 1 Stunde (maximal 24 Stunden) bei 4 °C abgedunkelt gelagert. Die Analyse bzw. gleichzeitige Isolierung der Antigen-spezifischen T-Zellen erfolgte mittels FACS-Sortierung durch Dr. Eckstein am FACSaria II (FACS Core Facility, Uniklinikum Heidelberg). Die Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden in 1,5 mL Eppendorftubes mit 200 μ L DPBS gesammelt, abzentrifugiert und ohne Flüssigkeit bei -80 °C gelagert.

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde mit dem Micro BCA Protein Assay Kit, beruhend auf der Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid*, BCA) Methode, durchgeführt (Smith *et al.*, 1985). Hierbei reduziert Cu^{2+} im alkalischen Milieu zu Cu^+ , in Abhängigkeit der vorliegenden Proteinkonzentration. Cu^+ reagiert mit der Bicinchoninsäure und bildet einen Komplex, dessen Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm messbar ist. Ein Proteinstandard (Albumin) wurde in einem linearen Konzentrationsverlauf von 60 μ g/mL bis 0 μ g/mL mit PF2D-Startpuffer verdünnt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Proteinstandard sowie der Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Probe wurde zusätzlich mit PF2D-Startpuffer auf 1:10, 1:100, 1:500 und 1:1.000 verdünnt, um den Konzentrationsbereich der Standardkurve abzudecken. Die kolorimetrische Reaktion wurde durch Zugabe von jeweils 100 μ L BCA-Reagenz gestartet und bei 60 °C für 30 Minuten inkubiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Extinktion der Proben im Mikrotiterplatten-Lesegerät (Tecan Infinite 200) bestimmt und mittels linearer Regression der Standardkurve errechnet.

3.2.2 Gefriergewebeschnitte

Tumorgewebe wurden nach der Entnahme schnellstmöglich in etwa 0,5 cm³ große Stücke zerkleinert, bei -160 °C in flüssigem Stickstoff gekühltem Isopentan schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Unter Berücksichtigung der Kühlkette wurden die kryokonservierten Gewebestücke in Tissue-Tek Compound Einbettmedium fixiert und in einem Kryotom (Cryostat Leica CM1850 UV) geschnitten. Jeweils zwei 5 µm dicke Gewebeschnitte wurden auf einen Adhäsionsobjektträger aufgetragen. Die Schnittpräparate wurden für 24 h bei RT getrocknet und anschließend für zehn Minuten in -20 °C kaltem Aceton fixiert. Zur Qualitätssicherung wurde von jedem Gewebestück der jeweils erste und letzte Schnitt einer Serie mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt und durch Prof. Dr. med. Andreas von Deimling (Abteilung für Neuropathologie, Universitätsklinikum Heidelberg) histopathologisch beurteilt. Als morphologische Kontrolle stellt die HE-Färbung ein Verfahren dar, welches durch die technischen Assistenten der Arbeitsgruppe routinemäßig durchgeführt wurde. Die Gewebeschnitte wurden für eine Minute in Hämatoxylin (Kernfärbung) und anschließend für fünf Sekunden in Eosin (Kontrastierung) gefärbt. Abschließend wurde eine Dehydrierung in ansteigender Ethanol-Verdünnungsreihe durchlaufen, die Schnitte mit Cytoseal 60 eingedeckt und bei RT gelagert.

3.2.3 Immunhistologie

Zur Validierung der Zell- und Gewebe-spezifischen Proteinexpression von TAAs wurden die Proteine durch spezifische Antikörper in LGG-Gewebeschnitten nachgewiesen. Zum Nachweis der Zielstrukturen, den sogenannten Antigenen, wurde die indirekte immunhistochemische Färbemethode verwendet. Hierbei bindet im ersten Schritt ein primärer Antikörper an das Antigen und bildet einen Antigen-Antikörperkomplex. Im zweiten Schritt erfolgt die Bindung eines Spezies-spezifischen Biotin-konjugierten Sekundärantikörpers an den Fc-Teil des Primärantikörpers. Zur Detektion wurde die Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Methode eingesetzt, bei der eine irreversible Bindung zwischen Avidin und Biotin stattfindet. Hierbei hat ein vorgefertigter Komplex aus Avidin und dem biotinylierten Enzym (*horseradish peroxidase*, HRP) an den biotinylierten Sekundärantikörper gebunden. Durch Zugabe des chromogenen Substrats 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) entsteht unter Anwesenheit von H₂O₂ eine Oxidation, wodurch das Antigen mittels präzipitierender Farbreaktion indirekt im Gewebeschnitt sichtbar gemacht wurde. Die Durchführung immunhistochemischer Färbungen erfolgte in dieser Arbeit ausschließlich an Aceton-fixierten Gewebeschnitten, weshalb keine gesonderte Vorbehandlung, eine sogenannte Antigen-Demaskierung, durchgeführt wurde. Hierzu wurden die bei -80 °C gelagerten Objektträger auf einer etwa 37 °C warmen Heizplatte zügig aufgetaut, um Gewebemodifikationen durch Kondenswasser zu vermeiden. Um Veränderungen der Antikörperkonzentration durch Auslaufen der Lösungen während der Färbung zu verhindern, wurden die Gewebeschnitte mit einem Fettstift (DAKO) umrandet. Die unkonjugierten Primärantikörper (Tabelle 11) sowie die Spezies-spezifischen Biotin-konjugierten Se-

kundärantikörper (Tabelle 12) wurden wie beschrieben angesetzt. Im ersten Inkubationsschritt wurden 40 μL des Primärantikörpers respektive der entsprechenden Isotypkontrolle auf die Gewebeschnitte gegeben und für eine Stunde bei RT in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe für jeweils 30 Minuten zuerst mit 40 μL Sekundärantikörper bzw. 40 μL Avidin-Biotin-Komplex inkubiert. Im Anschluss an jede Inkubationsphase erfolgten drei Waschschrte in PBS-T von je fünf Minuten. Zur Entwicklung der Farbreaktion wurden 40 μL das frisch angesetzten AEC-Substrats auf die Gewebe gegeben und die Entwicklung der Reaktion unter dem Mikroskop überprüft. Die Farbreaktion wurde abgestoppt, indem die Objektträger in destilliertes Wasser überführt wurden und dadurch die Aktivität der HRP inaktiviert wurde. Durch Gegenfärben in Hämatoxylin für etwa zwei Minuten wurden die Zellkerne blau angefärbt, die Gewebe anschließend mit Elvanol versehen und luftblasenfrei mit einem Deckglas eingedeckt.

Einzige Ausnahme ist hierbei die Färbung des Antigens TKT (LS-C114955) welches sich nicht auf Gefriergewebeschnitten etablieren ließ und daher mit freundlicher Unterstützung von Dr. med. David Reuss (Abteilung für Neuropathologie, Uniklinikum Heidelberg) auf Paraffingewebe gefärbt wurde (Reuss *et al.*, 2014).

Spezifitätskontrollen Die Grundlage für optimale Färbeergebnisse stellt sowohl der Gewebezustand als auch die Qualität bzw. Funktionalität der verwendeten Reagenzien dar. Die Interpretierbarkeit von sensitiven Färbungen kann sich jedoch aufgrund unspezifischer Reaktionen wie bspw. durch unspezifische Fc-Rezeptorbindung an Zellen, unspezifische Antikörperinteraktionen mit zellulären Proteinen oder auch durch die Autofluoreszenz der Zellen deutlich erschweren. Durch die Etablierungen der Antikörper wurden in Vorversuchen bereits die optimalen Antikörperkonzentrationen bestimmt. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, wurden außerdem zusätzliche Kontrollen durchgeführt. Der Einsatz von Antikörpern mit fehlender Antigenität, sogenannten Isotypkontrollen, sowie Kontrollansätzen, bei denen auf die Zugabe des Primärantikörpers verzichtet wurde, ermöglichten die Beurteilung der Spezifität einer Färbung sowie eine Evaluierung des Umfangs unspezifischer Bindungen an den zu untersuchenden Zellen bzw. dem zu untersuchenden Gewebe. Die Durchführung von Spezifitätskontrollen mittels Isotyp-Kontrollantikörper (Tabelle 12) erfolgte analog zu den in Methode 3.2.3 eingesetzten Primärantikörpern im Bezug auf die eingesetzte Konzentration sowie die Durchführung der Färbung.

3.2.4 Mikroskopieverfahren

Verfahren der Durchlicht-Mikroskopie Für mikroskopische Beurteilungen im Durchlicht-Modus wurden sowohl die Geräte Olympus CX31 (Gewebedünnschnitte) als auch Olympus CKX41 (Zellkulturflaschen) verwendet. Für mikroskopische Untersuchungen immunohistochemisch angefarbter Gewebedünnschnitte mit anschließender Bildgebung wurde das Olympus BX50 Mikroskop verwendet, welches

mit einer SC30 Kamera ausgestattet ist. Aufnahmen wurden je nach Bedarf in 4x, 10x und 20x Vergrößerung aufgenommen, mit der CellSens Software bearbeitet und im JPEG-Format abgespeichert.

3.2.5 Proteinfraktionierung im zweidimensionalen Chromatographie-System

Bei der ProteomeLab PF2D-Analyse, einer Proteinfraktionierung im zweidimensionalen Chromatographie-System (PF2D), wurden komplexe Proteingemische zuerst anhand der Summe aller Ladungen des Proteins, dem sogenannten isoelektrischen Punkt (pI oder auch IEP) und anschließend anhand der Hydrophobizität der enthaltenen Proteine aufgetrennt und automatisch fraktioniert (Beckhove *et al.*, 2010). Durch ein maschinelles Aufschlussverfahren wurden die Tumorgewebe zunächst homogenisiert und somit Proteinbestandteile freigesetzt. Die Auftrennung der Proteine in der ersten Dimension erfolgte durch das Prinzip der Chromatofokussierung (CF) (Abbildung 4, (1)). Mittels linearem pH-Gradienten wurden die Proteine am isoelektrischen Punkt zu scharfen Banden fokussiert und während der Elution durch einen Autosampler in definierten Fraktionen gesammelt. In der zweiten Dimension wurden Proteine mittels einer Umkehrphasen-Chromatographie (*Reversed-Phase Chromatography*, RPC) auf nicht

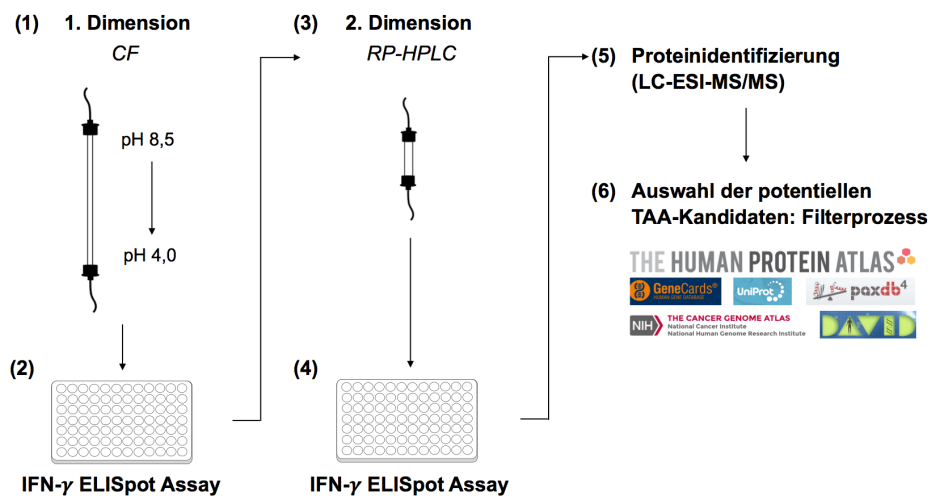


Abbildung 4: Arbeitsablauf zur Identifizierung potentieller TAA-Kandidaten mittels PF2D und IFN- γ ELISpot Assay. **(1)** In der ersten Dimension wurden Proteine im Tumorproteinlysat durch Chromatofokussierung (CF) in einem linearen pH-Gradienten (pH 8,5 - 4,0) aufgetrennt und automatisch fraktioniert. **(2)** Mittels IFN- γ ELISpot wurde in einem autologen Versuchsaufbau überprüft, ob die Patienten spontane T-Zell-vermittelte Immunantworten gegen die Tumor-Proteinfraktionen aufwiesen. **(3)** Immunogene Fraktionen wurden in der zweiten Dimension mittels Umkehrphasen-Chromatographie (*Reversed-Phase-High-Pressure-Liquid-Chromatography*, RP-HPLC) basierend auf der Hydrophobizität der Proteine weiter aufgetrennt. **(4)** Ein zweiter IFN- γ ELISpot ermöglicht erneut die Identifizierung immunogener Tumor-Proteinfraktionen, welche mittels **(5) Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry** (LC-ESI-MS/MS) massenspektrometrisch untersucht wurden, um die proteomischen Bestandteile zu bestimmen. **(6)** Definierte Ausschlusskriterien und eine umfangreiche Datenbankrecherche führten zur Selektion von potentiellen TAA-Kandidaten.

porösem Säulenmaterial anhand ihrer Hydrophobizität aufgetrennt (Abbildung 4, (3)). Der Vorteil dieses Verfahrens zur Fraktionierung komplexer Proteingemische bestand darin, dass sich die Proteine permanent in einer flüssigen Phase befanden, was zu einer besseren Konservierung der Proteinstruktur führte und damit einen direkten Einsatz in immunologischen Assays ermöglichte (Abbildung 4, (2)/(4)).

3.2.5.1 Homogenisierung von Tumorgeweben

Zur Herstellung eines Tumorproteinlysates wurden jeweils ca. 0,5 cm³ große bei -80 °C gelagerte Tumorstücke von Patienten mit einem IDH^{mut} LGG verwendet (Tabelle 19). Das Tumorgewebe wurde mit 500 µL Membran-Lysepuffer versetzt und für eine Minute maschinell im Ultraturax zerkleinert. Die im Membran-Lysepuffer enthaltenen Detergenzien emulgieren zusätzlich unlösliche Strukturen und unterstützen dadurch die Solubilisierung der Proteine. Das homogenisierte Tumorproteinlysate wurde mit Membran-Lysepuffer auf 2 mL aufgefüllt und für eine Stunde bei 14.000 xg und 4 °C zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Die Proteaseinhibitoren im Membran-Lysepuffer erhöhen die Stabilität der Proteine und ermöglichen dadurch zusätzlich eine langfristige Kryokonservierung bei -80 °C.

3.2.5.2 Pufferaustausch durch PD-10-Entsalzungssäulen

Detergenzien, die während der Homogenisierung für eine verbesserte Emulgation bzw. Solubilisierung eingesetzt wurden, maskieren die Eigenladung von Proteinen. Eine chromatographische Auftrennung basierend auf dem pI-Wert der Proteine ist daher erst nach erfolgreichem Pufferaustausch möglich. Die Verwendung von PD-10-Entsalzungssäulen stellt ein zügiges Umpufferungs- und Entsalzungsverfahren für kleine Volumina dar, welches auf dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) beruht. Hierbei diffundieren kleinere Moleküle (< 5 kDa) sowie Salze und Detergenzien in das poröse Säulenmaterial (SephadexTM G-25), wohingegen Proteine aufgrund ihrer Größe direkt eluiert werden. Die Säule wurde zuerst mit 25 mL PF2D-Start-Puffer equilibriert, anschließend wurden maximal 2,5 mL der Probe auf die Säule gegeben. Die Proteine wurden letztlich mit 3,5 mL PF2D-Start-Puffer von der Säule eluiert.

3.2.5.3 Durchführung der ersten Dimension-Chromatographie

In der ersten Dimension erfolgt die physikalische Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit vom pI-Wert der Zwitterione. Der pI-Wert beschreibt den *potentia Hydrogenii* (pH)-Wert, bei dem sich die Nettoladung aller positiver und negativer Ladungen innerhalb einer Proteinstruktur aufheben und somit Null betragen. Bei einem pH-Wert, der dem pI-Wert entspricht, löst sich ein Protein von den Adsorbentpartikeln der festen Phase (Säule) und geht in die mobile Phase (Puffer) über. Dieses Prinzip wurde bereits 1987 als sogenannte pH-Gradienten-Fokussierung beschrieben (Sluyterman und Elgersma, 1978).

Durch Chromatofokussierung wurden Proteine in einem pH-Gradienten (mobile Phase) durch die Mischung von Start- und Elutions-Puffer gelöst und über eine Ionenaustauschsäule (feste Phase) entsprechend ihres pI-Wertes eluiert. Zu Beginn der Chromatographie wurde die Säule sowie das gesamte Chromatographie-System mit Start-Puffer (pH 8,5) für 2 Stunden bei 0,2 mL/min luftblasenfrei äquilibriert. Anschließend wurde eine der Säulenkapazität entsprechende maximale Proteinkonzentration von 5 mg manuell in das System injiziert. Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte mittels eines pH-Gradienten von pH 8,5 - 4,0 bei einer konstanten Flussrate von 0,2 mL/min. Proteine, die innerhalb des pH-Gradienten von der Säule eluierten, wurden in definierten Intervallen von pH 0,3 fraktioniert. Anschließend erfolgte ein *Saltwash*-Schritt, bei dem der Elutions-Puffer durch einen salzhaltigen Waschpuffer ersetzt wurde, um unspezifisch gebundene Proteine von der Säule zu lösen. Hierbei wurden Proteinfraktionen in einem festgelegten Volumen von 1,5 mL gesammelt. Die Menge eluierender Proteine wurde durch Online-Messung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm am Säulenausgang bestimmt. Zu Qualitätszwecken wurden weitere physikalische Parameter wie Zeit, Temperatur und Druck aufgezeichnet und grafisch in einem Chromatogramm dargestellt (ProteoVue Software, Eprogen). Die verwendete HPCF-Säule wurde anschließend mehrmals mit HPLC-Wasser gespült (45 Minuten bei 0,2 ml/min) und in eine Isopropanol-Lösung umgepuffert. Fraktionen der ersten Dimension wurden mit HPLC-Wasser auf ein Probenvolumen von 1 mL aufgefüllt und direkt für immunologische Versuche (IFN- γ ELISpot) verwendet oder für bis zu maximal sechs Monate bei -80 °C kryokonserviert.

Vorbereitung der Fraktionen für den IFN- γ ELISpot Assay Im IFN- γ ELISpot wurden die Proteinfraktionen der ersten Dimension dazu eingesetzt, um die Immunogenität der darin enthaltenen Proteine zu überprüfen. Da die im Puffer enthaltenen Salze eine schädliche Wirkung auf lebende Zellen haben und damit zu sogenannten Störeffekten führen würden, wurden diese mittels Ultrafiltration entfernt. Die Ultrafiltration ist eine schnelle Methode, um Proteine aufzukonzentrieren bzw. Substanzen, die kleiner sind als die Porengröße der verwendeten Membran, abzureichern. Moleküle, die größer sind als die Ausschlussgröße der Membran (10 kDa), dem sogenannten *Molecular Weight Cut Off* (MWCO), werden von dieser zurückgehalten und damit aufkonzentriert. Jeweils 100 μ L der Probe wurden in einer Amicon Ultra-4 Ultrafiltrationseinheit mit DPBS verdünnt und bei 4.000 xg zentrifugiert, bis ein Probenvolumen von 50 μ L erreicht wurde. Die umgepufferten Proteinfraktionen wurden in Protein Lobind-Reaktionsgefäße überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C kryokonserviert.

3.2.5.4 Durchführung der zweiten Dimension-Chromatographie

Tumor-Proteinfraktionen der ersten Dimension, die im Patienten eine spontane T-Zell-vermittelte Immunantwort hervorgerufen hatten, wurden in der zweiten Dimension des PF2D-Systems weiter untersucht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften mittels einer

Reversed-Phasen-Chromatographie. Hierfür wurde eine RP-HPLC-Säule in das Gerät eingebaut und durch das Heizmodul auf 50 °C erwärmt. Das komplette System wurde bei einer konstanten Flussrate von 0,75 mL/min zuerst für 5 Minuten mit einem Acetonitril-Puffer (0,08 % Trifluoressigsäure (*Trifluoroacetic Acid*, TFA)) und anschließend für 10 Minuten HPLC-Wasser (0,1 % TFA) luftblasenfrei äquilibriert. Ein Probenvolumen von 200 µL wurde durch die automatisierte Injektionsnadel, dem sogenannten *Autosampler*, mittels vordefiniertem Pipettierschema aus den Fraktionsplatten der ersten Dimension entnommen und in das System injiziert. Die Proben wurden für 30 Minuten bei einer konstanten Flussrate von 0,75 mL/min über eine *non-porous C18 RP*-Säule aufgetrennt. Durch einen graduellen Pufferaustausch von HPLC-Wasser (0,1 % TFA) durch Acetonitril-Puffer (0,08 % TFA) werden sukzessive Proteine mit ansteigender Hydrophobizität eluiert. Die Menge eluierender Proteine wurde durch Online-Messung der UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 214 nm am Säulenausgang bestimmt. Die eluierenden Proteine wurden mit einem konstanten Probenvolumen von 0,45 mL fraktioniert. Das in den Puffern enthaltene TFA wurde in den Fraktionen durch Zugabe von je 40 µL 0,4 M NH_4HCO_2 pro Well neutralisiert, was eine saure Proteolyse sowie ein unspezifisches Anhaften an die Mikrotiterplatten verhinderte. In dieser Form wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung im IFN- γ ELISpot Assay bzw. in der Massenspektroskopie bei -80 °C kryokonserviert.

Vorbereitung der PF2D-Fraktionen für weitere Analysen Für massenspektrometrische Analysen bzw. um die Immunogenität von Proteinfractionen der zweiten Dimension im IFN- γ ELISpot zu überprüfen, mussten die Proben aufgrund des im Puffers enthaltenen TFA vorbehandelt werden. Hierzu wurden 200 µL der zuvor neutralisierten Probe in ein Protein Lobind-Reaktionsgefäß überführt und mit geöffnetem Verschluss bei 35 °C in einer Savant SpeedVac vollständig eingetrocknet. Das Protein-Präzipitat wurde eingetrocknet bzw. in einem Restvolumen von etwa 25 µL Acetonitril-Puffer (0,08 % TFA) bei 4 °C bis zur Analyse aufbewahrt. Für die Verwendung im IFN- γ ELISpot Assay wurden die eluierten Fraktionen, wie bereits beschrieben, direkt in DPBS umgepuffert und in Lobind-Reaktionsgefäßen bei -80 °C kryokonserviert.

3.2.6 Massenspektrometrische Analyse immunogener Tumor-Proteinfractionen

Zur Identifizierung proteomischer Bestandteile in immunogenen Fraktionen der zweiten Dimension wurden massenspektrometrische Analysen durch die AG Schnölzer (*Genomics and Proteomics Core Facility*, DKFZ) an einem LTQ-Orbitrap-XL durchgeführt. Die Proben wurden mittels SpeedVac, wie bereits zuvor beschrieben, eingetrocknet, rekonstituiert und durch Zugabe von Trypsin proteolytisch verdaut. Die Proteolyse durch Trypsin führt zu spezifischen Spaltstellen am carboxyterminalen Ende von Arginin- bzw. Lysinresten. Die Sequenzabfolge der beiden genannten Aminosäuren nach einem Prolinrest verhindert jedoch die Trypsinierung an dieser Stelle. Darauf aufbauend erhält man Peptide mit definierten

Spaltstellen, deren Masse mittels *Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry* (LC-ESI-MS/MS) detektiert wurde. Anhand von spezifischen Ionenserien (y- und b-Fragmente) wurden mit der Software Mascot (Matrix Science) und der SwissProt Datenbank (www.uniprot.org, (UniProt Consortium, 2015)) retrospektiv die Peptidsequenzen errechnet (Aretz *et al.*, 2013).

Der Datenbankabgleich wurde mit den voreingestellten Standardparametern durchgeführt. Manuelle Spezifikationen wurden für das Taxon = *Eukaryotes*, den Messfehler = 0,4 Da, mögliche Protein-Modifizierung = *Carbamidomethyl*, weitere Modifizierungen = *Oxidation*, den Protease-Verdau = Trypsin und die Auswahl des Gerätes = Orbitrap (20 ppm) vorgenommen.

3.2.6.1 Auswertung massenspektrometrischer Daten: Filterprozess

Die Proteinsequenz wurde anhand der Masse einzelner Aminosäuren bestimmt, die der Differenz zweier Peaks innerhalb eines Fragmentspektrums bei der LC-ESI-MS/MS entsprachen. Die Grenzen dieses Verfahrens zeigten sich besonders bei Ionenserien, die nicht vollständig oder fehlerhaft detektiert wurden. Auch der Abgleich mit Datenbanken kann bei ungenauen Messungen die Menge an identifizierbaren Proteinen verringern. Um die Anzahl an falsch-positiv identifizierten Proteinen zu reduzieren, erfolgte eine Aufbereitung der MS/MS-Rohdaten. Die im Folgenden beschriebenen Ausschlusskriterien wurden angewandt, um nicht vollständig oder nicht zuverlässig identifizierte Proteine von weiteren Analysen auszuschließen. Proteine mit einer hohen Sequenzabdeckung (*Coverage* > 10 %) und einer großen Anzahl übereinstimmender Peptide (*Matches* > 5) wurden für „identifiziert“ erachtet. Somit wurden insgesamt 3.319 Proteine aus immunogenen Fraktionen aller vier Patienten identifiziert.

Nach Ausschluss von mehrfach identifizierten Peptiden (n = 422) umfasste die Liste insgesamt 2.897 Proteine, die zur Auswahl potentieller TAA-Kandidaten untersucht wurden. Zuerst wurden nicht hirnspezifische Proteine wie z.B. Keratin (-1, -2, -9, -10) (Hodge *et al.*, 2013), Hornerin (Beckhove *et al.*, 2010) und Dermcidin von weiteren Auswahlprozessen ausgeschlossen, da sie häufig als unspezifische Kontaminationen während der Probenprozessierung durch Staub bzw. Hautschuppen in die Proben gelangen (Keller *et al.*, 2008).

Anschließend wurde die Funktion sowie die Expressionsstärke (mRNA/Protein) der Proteine in den verschiedenen Geweben des menschlichen Körpers charakterisiert, um mögliche TAA-Kandidaten zu selektionieren. Des Weiteren wurde recherchiert, inwiefern die identifizierten Proteine bereits im Kontext von malignisierenden Erkrankungen beschrieben wurden und welche Rolle sie in krebsrelevanten Signalwegen spielen. Die Datenbank David Bioinformatics (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>, (Dennis *et al.*, 2003)) wurde dazu genutzt, um die *Protein Go Accession* in die *Official Gene ID* zu konvertieren. Eine funktionelle Annotation der Proteine wurde mit UniProt (www.uniprot.org) durchgeführt (UniProt Consortium, 2015). Für genomische, transkriptomische und proteomische Charakterisierungen wurde außerdem auf die Datenbanken *GeneCards*, *The Human Protein Atlas* (Uhlen *et al.*, 2010), *Rembrandt*

und *The Cancer Genome Atlas* zurückgegriffen (Brat *et al.*, 2015).

3.3 Bioinformatische Methoden

3.3.1 Vorhersage von MHC-I-präsentierten T-Zell-Epitopen

Zur Prädiktion der Immunogenität von Peptiden wurden die entsprechenden Aminosäuresequenzen der Proteine (FASTA-Format) mittels der Online-Protein-Datenbank *UniProt Consortium* bestimmt.

Die Prädiktion von MHC-Klasse-I-Epitopen als lange Version (50-mer) erfolgte unter Verwendung der öffentlich verfügbaren Datenbank *The Immune Epitope Database* (IEDB) (Vita *et al.*, 2009). Zur Prädiktion wird der NetMHCpan (Ver.2.8) Algorithmus verwendet, welcher auf experimentell ermittelten Werten zur Bindeaffinität und T-Zell-Aktivierung durch MHC-Klasse-I präsentierter Antigene basiert. Des Weiteren verfügt die Datenbank über das größte Repertoire an charakterisierten B-Zell- und T-Zell-Epitopen sowie Daten zur TAP-Prozessierung (*immune proteasome*), die ebenfalls in den Algorithmus mit einbezogen werden (Charoentong *et al.*, 2012).

- Für die Prädiktion der 50-mer Peptide wurden nur die in Deutschland am häufigst vertretenen HLA-Allele untersucht (siehe Tabelle 24) (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2015).
- Die Prädiktion von kurzen Peptiden (8-, 9-, 10-mer) zur Bestimmung reaktiver Epitope innerhalb von immunogenen 50-mer Peptiden wurde ausschließlich auf das Allel HLA-A*02:01 (Häufigkeit in der deutschen Bevölkerung: 49,9 %) restringiert (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2015).

Um die Immunogenität der prädiktierten (8-, 9-, 10-, 50-mer) Epitope zu validieren, wurden chemisch synthetisierte Peptide durch die Genomics & Proteomics Core Facility (DKFZ) hergestellt und für die IFN- γ ELISpot Analysen eingesetzt. Peptidsequenzen wurden auf eine maximale Länge von 50 AS beschränkt, was auf Limitierungen des Herstellungsverfahrens zurückzuführen ist (Tzschucke *et al.*, 2002). Bei der sogenannten Festphasen-Peptidsynthese werden einzelne Aminosäuren chemisch aneinander synthetisiert, wobei sowohl die Effizienz als auch die Reinheit der entstehenden Peptide mit zunehmender Länge abnimmt. Die lyophilisierten Peptide wurden in DMSO gelöst ($c = 100 \mu\text{L}/\mu\text{g}$) und

Tabelle 24: Häufigkeitsverteilung von HLA-Typen in der deutschen Bevölkerung (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2015)

HLA-Allel	Häufigkeit [%]
HLA-A*02:01	49,9
HLA-A*03:01	28,6
HLA-A*01:01	27,7
HLA-B*07:01	24,5
HLA-A*24:01	18,1

bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur Verwendung in IFN- γ ELISpot Analysen wurden die Peptide mit sterilem pyrogenfreiem Wasser auf eine Endkonzentration von $10\text{ }\mu\text{L}/\mu\text{g}$ verdünnt.

3.4 Statistik

Statistische Datenanalysen, Berechnungen sowie graphische Darstellungen wurden mit Microsoft Excel, Graphpad Prism und der Statistik-Software R Studio durchgeführt.

Unter der Annahme, dass es sich bei den vorliegenden Daten um zwei unabhängige Stichproben mit Normalverteilung handelt, wurden die Mittelwerte durch den Student's t-Test mit zweiseitiger Fragestellung verglichen. Zur Bestimmung der Signifikanz mehrerer Stichproben wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Resultierende p -Werte $< 0,05$ wurden als signifikant erachtet.

In den Abbildungen dieser Arbeit wurden Sternchen (*) zur Darstellung der Signifikanzniveaus verwendet (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

In Balkendiagrammen wurden die Mittelwerte mit entsprechendem Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) aufgetragen. Boxplots (*Box-Whisker-Plots*) repräsentieren standardmäßig den Mittelwert mit dem 95 %-Konfidenzintervall (5-95 %) oder umfassen wie bei ELISpot-Auswertungen alle Ausreißer (Minimum/Maximum). Statistische Überlebensanalysen wurden mittels Log Rank-Test (nicht-parametrisch) untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung von potentiellen TAA-Kandidaten in IDH^{mut}

LGGs

4.1.1 Qualitative Beurteilung des Tumoranteils in IDH^{mut} LGG-Geweben

Das Ausgangsmaterial für die proteomischen Untersuchungen zur Identifizierung von Zielstrukturen T-Zell-vermittelter Immunantworten bildete lysiertes Tumorgewebe. Zur Sicherstellung der Gewebequalität wurden zunächst von allen Patienten des IDH^{mut} LGG Studien-Kollektivs (Tabelle 19) Gefriergewebeschnitte der entsprechenden Tumorgewebe angefertigt und der prozentuale Tumoranteil mittels HE-Färbung histopathologisch bestimmt. Für alle in Tabelle 19 aufgeführten IDH^{mut} LGG-Gewebe konnte ein Tumoranteil von > 60 % sichergestellt werden.

4.1.2 Identifizierung immunogener Proteinfractionen mittels PF2D

Die Tumorlysate der vier Patienten des vorliegenden IDH^{mut} LGG Studien-Kollektivs (Tabelle 19) wurden mittels PF2D und IFN- γ ELISpot Assay analysiert. Die Ergebnisse sind in diesem Kapitel repräsentativ für Patient NCH1150 dargestellt (Abbildung 5, Anhang Abbildung 33). In der ersten Dimension erfolgte die Fraktionierung des Tumorlysats mittels Chromatofokussierung basierend auf dem pI-Wert der enthaltenen Proteine (Abbildung 5, A). Neben dem Druck und dem pH-Wert, wurde auch die UV-Absorption online gemessen und fortlaufend aufgezeichnet. Basierend auf den Werten der UV-Absorption konnten Rückschlüsse über die in der jeweiligen Fraktion enthaltene Proteinmenge getroffen werden. Aufgrund der Limitierung von verfügbarem Blut der Patienten wurden für den IFN- γ ELISpot Assay nur Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration bzw. Kombinationen aus mehreren Proteinfractionen gesammelt und untersucht. Die Durchführung des IFN- γ ELISpot Assays für diesen Teil der Arbeit erfolgte durch Dr. Slava Stamova (Abteilung Translationale Immunologie, DKFZ). Für Patient NCH1150 zeigten sich bei Fraktionen der ersten Dimension signifikant erhöhte IFN- γ Spot-Zahlen für die Fraktionen F6, F13, F17, F18 und F19 (grau hinterlegt) im Bezug auf die Negativkontrolle (PBL) (Abbildung 5, B). Um die Komplexität der proteomischen Bestandteile immunogener Fraktionen der ersten Dimension weiter zu reduzieren, wurden diese mittels RP-HPLC basierend auf der Hydrophobizität der Proteine weiter auf-

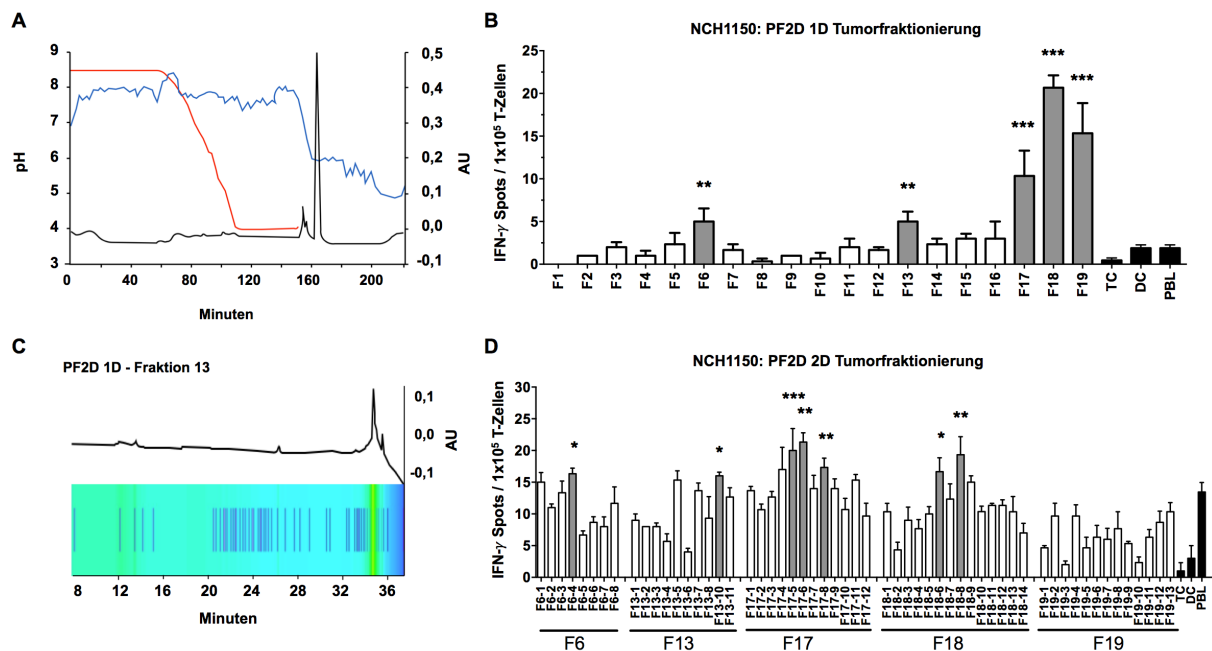


Abbildung 5: Repräsentative Darstellung der ersten und zweiten Dimension der PF2D und ELISpot-Analyse von Patient NCH1150. **A** Chromatogramm der ersten Dimension (1D), als kombinierte Darstellung der Verläufe für UV (schwarz), pH (rot) und Druck (blau). Fraktionen (F) wurden während des pH-Gradienten (8,5 - 4,0) in pH 0,3-Intervallen in einer 96-Well-Platte gesammelt. **B** IFN- γ ELISpot der 1D-Fractionen des Tumorslysats von NCH1150. Das Lysat von T-Zellen (TC), dendritischen Zellen (DC) sowie von peripheren Blut Lymphozyten (*Peripheral Blood Lymphocytes*, PBL) wurde als Negativkontrolle verwendet. *Staphylococcus Aureus* Enterotoxin-B (SEB) diente als Positivkontrolle (Daten nicht gezeigt). Fraktionen mit einer signifikant erhöhten spontanen T-Zell-vermittelten Immunantwort sind grau hinterlegt und wurden für weitere Analysen verwendet. **C** Kombinierte Darstellung eines Chromatogramms und der entsprechenden Heatmap der zweiten Dimension (2D), resultierend aus der Analyse von NCH1150 1D-Fraktion 13 (repräsentatives Beispiel). **D** IFN- γ ELISpot der 2D-Fractionen des Tumorslysats von NCH1150. Die Balkendiagramme stellen jeweils den Mittelwert \pm SEM dar. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$)

getrennt. Die Auswahl von Fraktionen der zweiten Dimension basierte auf der Heatmap-Darstellung (Abbildung 5, C), bei der die Menge eluierter Proteine durch den Farbverlauf dargestellt ist und die Höhe des UV-Peaks im Chromatogramm widerspiegelt.

Entsprechend der Chromatogramme wurden bis zu 14 Fraktionen (F18) ausgewählt und mittels IFN- γ ELISpot analysiert (Abbildung 5, C). Auch für Fraktionen der zweiten Dimension fanden sich signifikant erhöhte IFN- γ Spot-Zahlen. Während sich in Fraktion F19 keine, bzw. für Fraktion F6 (F6-4) und F13 (F13-10) jeweils nur eine einzelne signifikant erhöhte T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen eine Fraktion der zweiten Dimension zeigte, konnten in Fraktion F17 und F18 gleich mehrere signifikante T-Zell-vermittelte Immunantworten identifiziert werden (grau hinterlegt). Fraktion F17 zeigte gegen alle getesteten Fraktionen eine deutlich erhöhte T-Zell-Antwort, wobei Fraktionen F17-5, -6 und -8 jeweils signifikant erhöhte IFN- γ Spot-Zahlen aufwiesen. Auch Fraktion F18 stimulierte mit den Fraktionen F18-6 und -8 T-Zellen zu einer signifikant erhöhten IFN- γ -Sekretion. Um die proteomischen Bestandteile im-

munogener Tumor-Proteinfraktionen der zweiten Dimension zu identifizieren, wurden diese im Weiteren durch massenspektrometrische Untersuchungen analysiert.

4.1.3 Massenspektrometrische Untersuchung immunogener Proteinfraktionen

Die Durchführung massenspektrometrischer Analysen mittels LC-ESI-MS/MS oblag der AG Schnölzer (Genomics and Proteomics Core Facility, DKFZ). Tumor-Proteinfraktionen der zweiten Dimension, die eine signifikant erhöhte T-Zellantwort in den jeweiligen Patienten hervorgerufen hatten (Abbildung 5, C), wurden nach entsprechender Vorbereitung durch die Zugabe von Trypsin proteolytisch verdaut. Die durch die Proteolyse entstandenen Peptidfragmente mit charakteristischen Spaltstellen wurden mittels LC-ESI-MS/MS massenspektrometrisch analysiert. Die Auswertung der Spektren, bestehend aus y- und b-Fragment-Ionenserien, bzw. die Identifizierung der Proteinsequenzen mittels Mascot-Software und der SwissProt Datenbank wurde ebenfalls durch die AG Schnölzer durchgeführt (Aretz *et al.*, 2013). Die absolute Menge identifizierter Proteine pro Patient ist stark von der Anzahl untersuchter Fraktionen abhängig (Tabelle 25). Nach Ausschluss falsch-positiv identifizierter Proteine (*Coverage* > 10 % und *Matches* n > 5) sowie unspezifischer Kontaminationen (Keratin 1,2,9,10 (Hodge *et al.*, 2013); Hornerin; Dermcidin (Beckhove *et al.*, 2010)) und Duplikaten wurden durchschnittlich 101 Proteine pro 2D-Tumor-Proteinfraktion identifiziert. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen astrozytären und oligodendroglialen Tumoren oder den unterschiedlichen WHO-Graden (Tabelle 25). Im Durchschnitt wurden die meisten Proteine pro Fraktion (n = 134) in Patient NCH1150 identifiziert, während die Fraktionen von Patient NCH1390 bspw. nur 81 identifizierte Proteine aufwiesen. Die Schnittmenge aller massenspektrometrisch identifizierter Antigene der vier LGG-Patienten betrug 73 Proteine (3,6 %) (Abbildung 6, A). Im Einzelnen betrachtet wies die Schnittmenge von Astrozytom-Patienten (19,7 %) und Oligodendrogliom-Patienten (17,5 %) prozentual gesehen eine vergleichbare Menge überlappend identifizierter Proteine auf (Abbildung 6, B-C). Unter den identifizierten Proteinen fanden sich hauptsächlich Bestandteile der Zellkompartimente (43,6 %) und Zellorganellen (38,2 %) und kaum Membranproteine (3,6 %) oder extrazelluläre Proteine (1,8 %) (siehe Anhang: Abbildung 34).

Tabelle 25: Patienten-spezifische Auflistung der immunogenen Tumor-Proteinfraktionen der zweiten Dimension (2D) sowie der massenspektrometrisch identifizierten Proteine

Patient	Diagnose	WHO ^o	Immunogene 2D-Fraktionen	Identifizierte Proteine
NCH519a	Astrozytom	II	6	542
NCH1150	Astrozytom	II	7	940
NCH612	Oligodendrogliom	III	6	616
NCH1390	Oligodendrogliom	III	15	1.221

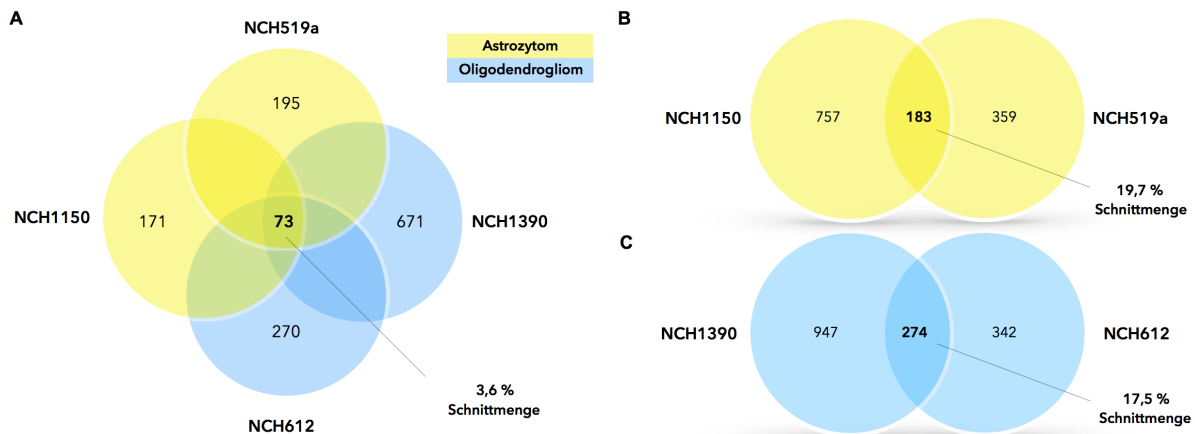


Abbildung 6: Grafische Darstellung der Anzahl Patienten-spezifisch identifizierter Proteine sowie der Schnittmenge zwischen den Patienten. **A** Das Venn-Diagramm verdeutlicht die Schnittmengen massenspektrometrisch identifizierter Proteine in den Patienten NCH1150, NCH519a, NCH1390 und NCH612 sowie den LGG-Subentitäten Astrozytom (gelb) und Oligodendrogliom (blau). Für einen detaillierteren Vergleich wurden die LGG-Subentitäten **B** Astrozytom und **C** Oligodendrogliom separiert und getrennt voneinander betrachtet.

Somit wurden durch massenspektrometrische Untersuchungen aller vier Patienten insgesamt 3.319 Proteine in 34 immunogenen Tumor-Proteinfraktionen identifiziert, die im Folgenden hinsichtlich ihrer Funktion, ihrer biologischen Relevanz sowie ihrer Immunogenität weiter charakterisiert wurden (Tabelle 25).

4.1.4 Auswahl potentieller T-Zell-Zielstrukturen

Die Auswahl potentieller T-Zell-Zielstrukturen erfolgte aus der Summe aller massenspektrometrisch identifizierten Proteine ($n = 3.319$). Im ersten Schritt erfolgte eine Reduzierung der Proteine, die mehrfach in den untersuchten Patienten identifiziert wurden ($n = 422$). Insgesamt wurden somit 2.897 Proteine einer ausführlichen Literatur- und Datenbankrecherche unterzogen. Obwohl die jeweiligen Antigene mittels PF2D proteomisch im untersuchten Tumorlysate nachgewiesen wurden, erfolgte eine semi-quantitative Überprüfung der Proteinexpressionen in der Datenbank *The Human Protein Atlas*. Proteine, die bereits in hohem Maße in Normalgeweben exprimiert werden, wurden aus weiteren Rechenschritten ausgeschlossen. Hierzu gehörten unter anderem konstitutiv exprimierte Proteine wie bspw. Lamin A/C (LMNA). Ausschließlich Kandidaten mit einer selektiven und Tumor-spezifischen Proteinexpression wurden für eine ausführliche Literaturrecherche ausgewählt. Besonders Proteine wie bspw. Differenzierungsantigene, überexprimierte Antigene, Embryonalantigene aber auch Antigene, deren Funktion bereits kausal mit der Entstehung bzw. der Tumorigenität von Neoplasien beschrieben sind, wurden für weitere Analysen ausgewählt (Novellino *et al.*, 2004). Ein besonderes Augenmerk wurde auf Proteine gelegt, die bereits in krebisrelevanten Signalwegen beschrieben wurden oder eine entscheidende Rolle für das Tumorwachstum, für die Proliferation der Zellen und die damit verbundene Gefäßneubildung

(Angiogenese) spielen.

Basierend auf diesen Kriterien wurden daher aus 2.897 identifizierten Proteinsequenzen insgesamt 79 Proteine zur immunologischen Charakterisierung ausgewählt (Tabelle 26). Unter den 79 ausgewählten Proteinen befanden sich immunrelevante Proteine, sowie Proteine, deren biologische Funktion mit dem Zellzyklus bzw. dem Zelltod ($n = 9-15$, $p < 0,001$) assoziiert sind (*GO-TERM* Analyse) (siehe Anhang Tabelle 36). Funktionell lassen sich die ausgewählten Proteine entzündlichen Prozessen ($n = 3$, $p < 0,001$) oder Tumor-supprimierenden Prozessen ($n = 4$, $p < 0,001$) zuordnen (Anhang Tabelle 35).

Tabelle 26: Auflistung der ausgewählten Proteine für weitere Analysen

Protein ID	Uniprot ID	Proteinname
AIP	O00170	<i>Aryl hydrocarbon receptor-interacting protein</i>
ANXA1	P04083	<i>Annexin A1</i>
ANXA2	P07355	<i>Annexin A2</i>
ARHGDI1A	P52565	<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</i>
BAG3	O95817	<i>BAG family molecular chaperone regulator 3</i>
BCAN	Q96GW7	<i>Brevican core protein</i>
BIN1	O00499	<i>Myc box-dependent-interacting protein 1</i>
BLMH	Q13867	<i>Bleomycin hydrolase</i>
CA1	P00915	<i>Carbonic anhydrase 1</i>
CAPZA2	P47755	<i>F-actin-capping protein subunit alpha-2</i>
CCDC50	Q8IVM0	<i>Coiled-coil domain-containing protein 50</i>
CFL1	P23528	<i>Cofilin-1</i>
CNDP2	Q96KP4	<i>Cytosolic non-specific dipeptidase</i>
CNTN1	Q12860	<i>Contactin-1</i>
CRKI	P46108-2	<i>Adapter molecule crk</i>
CRKII	P46108-1	<i>Adapter molecule crk</i>
CRYAB	P02511	<i>Alpha-crystallin B chain</i>
CST3	P01034	<i>Cystatin-C</i>
CTSB	P07858	<i>Cathepsin B</i>
CTTN	Q14247	<i>Src substrate cortactin</i>
DDAH1	O94760	<i>N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1</i>
DDT	P30046	<i>D-dopachrome decarboxylase</i>
DPYSL3	Q14195	<i>Dihydropyrimidinase-related protein 3</i>
DSG1	Q02413	<i>Desmoglein 1</i>
DTNA	Q9Y4J8	<i>Dystrobrevin alpha</i>
ECHS1	P30084	<i>Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial</i>
EEF2	P13639	<i>Elongation factor 2</i>
EPB41L2	O43491	<i>Band 4.1-like protein 2</i>
EZR	P15311	<i>Ezrin</i>
FH	P07954	<i>Fumarate hydratase, mitochondrial</i>
FSCN1	Q16658	<i>Fascin</i>
GAL7	P47929	<i>Galectin-7</i>
GMFB	P60983	<i>Glia maturation factor beta</i>
GRB2	P62993	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
HLIM	P48742	<i>LIM/homeobox protein Lhx1</i>
HSPA4	P34932	<i>Heat shock 70 kDa protein 4</i>
HSPA5	P11021	<i>Heat shock 70 kDa protein 5</i>

Protein ID	Uniprot ID	Proteinname
HSPB1	P04792	<i>Heat shock protein beta-1</i>
IGFBP2	P18065	<i>Insulin-like growth factor-binding protein 2</i>
INA	Q16352	<i>Alpha-internexin</i>
KHSRP	Q92945	<i>Far upstream element-binding protein 2</i>
LDHB	P07195	<i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>
LGALS1	P09382	<i>Galectin-1</i>
MAPK1	P28482	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>
MARCKS	P29966	<i>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</i>
MSN	P26038	<i>Moesin</i>
MTDH	Q86UE4	<i>Protein LYRIC</i>
NIT2	Q9NQR4	<i>Omega-amidase NIT2</i>
NME2	P22392	<i>Nucleoside diphosphate kinase B</i>
OMG	P23515	<i>Oligodendrocyte-myelin glycoprotein</i>
PARK7	Q99497	<i>Protein deglycase DJ-1</i>
PCNP	Q8WW12	<i>PEST proteolytic signal-containing nuclear protein</i>
PEA15	Q15121	<i>Astrocytic phosphoprotein PEA-15</i>
PKM2	P14618-1	<i>Pyruvate kinase PKM</i>
PPP1CA	P62136	<i>Serine/threonine phosphatase PP1-alpha catalytic subunit</i>
PRDX1	Q06830	<i>Peroxiredoxin-1</i>
PRDX4	Q13162	<i>Peroxiredoxin-4</i>
PSMD9	O00233	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9</i>
PURA	Q00577	<i>Transcriptional activator protein Pur-alpha</i>
RTN1-A	Q16799-1	<i>Reticulon-1</i>
RTN1-B	Q16799-2	<i>Reticulon-1</i>
S100A8	P05109	<i>Protein S100-A8</i>
S100A9	P06702	<i>Protein S100-A9</i>
SBSN	Q6UWP8	<i>Suprabasin</i>
SEPT2	Q15019	<i>Septin-2</i>
SEPT11	Q9NVA2	<i>Septin-11</i>
SERPINB3	P29508	<i>Serpin B3</i>
SERPINB5	P36952	<i>Serpin B5</i>
SERPINB12	Q96P63	<i>Serpin B12</i>
SIRPA	P78324	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type substrate 1</i>
SNRNP70	P08621	<i>U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa</i>
SOD1	P00441	<i>Superoxide dismutase [Cu-Zn]</i>
SPRR2E	P22531	<i>Small proline-rich protein 2E</i>
STIP1	P31948	<i>Stress-induced-phosphoprotein 1</i>
TF	P02787	<i>Serotransferrin</i>
TKT	P29401	<i>Transketolase</i>
TUBB	P07437	<i>Tubulin beta chain</i>
VCAN	P13611	<i>Versican core protein</i>
VIM	P08670	<i>Vimentin</i>

4.1.5 Vorhersage von MHC-Klasse-I-Epitopen der potentiellen TAA-Kandidaten

Um zu prüfen, ob Antigene der von uns ausgewählten Proteine tatsächlich für die nachgewiesenen T-Zellantworten gegen immunogene 2D-Tumor-Proteinfraktionen verantwortlich waren, wurden im Weiteren mittels *in silico*-Vorhersage lange 50-mer Peptide (50 AS) bestimmt, welche mit einer hohen Wahrscheinlichkeit durch APCs prozessiert und auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden.

Hierfür wurden die isoformspezifischen Proteinsequenzen (Uniprot ID) der aufgeführten Proteine ermittelt (Tabelle 26) und durch den NetMHCpan (Ver.2.8) Algorithmus für die in Tabelle 24 aufgeführten HLA-Moleküle analysiert (www.IEDB.org). Bei der Selektion geeigneter Peptide wurde darauf geachtet, dass die Sequenzbereiche sowohl eine hohe durchschnittliche Bindeaffinität (*half maximal inhibitory concentration*, IC_{50}) als auch eine große Anzahl verschiedener HLA-Epitope ($IC_{50} < 500$ nM) aufweisen. Die grafische Auswertung der *in silico*-Vorhersage ist repräsentativ für NME2 (Abbildung 7) dargestellt und wurde für alle 79 potentiellen Kandidaten analog durchgeführt.

Hierfür wurden zuerst die Aminosäuresequenzen der Proteine im FASTA-Format (Abbildung 7, A) in die Datenbank geladen. Durch den Algorithmus wurde unter anderem die Bindeaffinität der 50-mer Peptide für die vordefinierten HLA-Typen (Abbildung 24) errechnet. Diese sind als mittlere Bindeaffinität (blaue Linie) in Abbildung 7 B dargestellt (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2015). Der Farbverlauf von weiß zu blau repräsentiert graphisch die zunehmende Bindestärke bzw. den kleiner werdenden IC_{50} -Wert. Die Anzahl möglicher Epitope mit einer Bindeaffinität $IC_{50} < 500$ nM lässt sich durch die schwarzen Balken erkennen. Für NME2 (Uniprot ID: P22392, Proteinlänge: 151 AS) wurde daher der Bereich zwischen AS 40 und AS 90 ausgewählt (rot markiert), der in der ersten Hälfte des 50-mers eine hohe Bindeaffinität mit bis zu sechs Epitopen ($IC_{50} < 500$ nM) bzw. in der zweiten Hälfte eine etwas geringere Affinität, jedoch mit bis zu sieben möglichen Epitopen ($IC_{50} < 500$ nM) aufwies. Eine vollständige Auflistung der *in silico* vorhergesagten Aminosäuresequenzen aller potentiellen TAA-Kandidaten findet sich in Tabelle 16. Die so vorhergesagten langen 50-mer Peptide wurden durch die AG Beckhove (Abteilung Translationale Immunologie, DKFZ) synthetisiert und als lyophilisierte Peptide bis zur Verwendung bei -20 °C

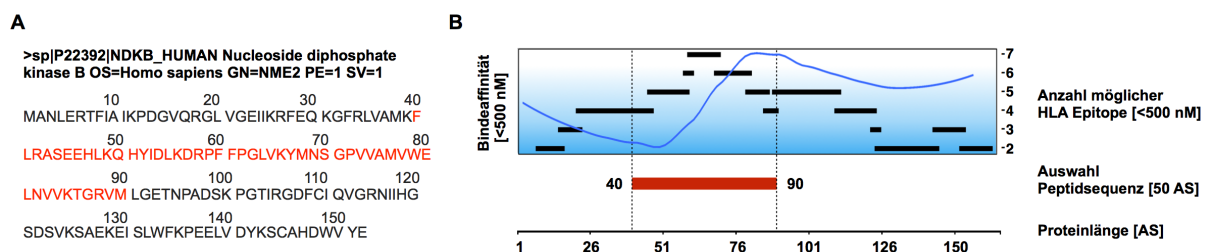


Abbildung 7: *In Silico*-Vorhersage von langen Peptiden der potentiellen TAA-Kandidaten (50 AS). **A** Die Proteinsequenz (FASTA-Format) von NME2 (UniProt ID: P22392) wurde über www.uniprot.org bezogen. **B** Grafische Darstellung der Epitop-Vorhersage. Die mittlere Bindeaffinität über alle HLA-Typen (blaue Linie) verdeutlicht über den Farbverlauf von weiß zu blau eine zunehmende Bindeaffinität. In Kombination mit einer hohen Anzahl möglicher HLA-Epitope ($IC_{50} < 500$ nM) führte dies zur Auswahl eines 50 Aminosäure (AS) langen Peptids (50-mer).

gelagert. Aufgrund des umfangreichen Kollektivs potentieller T-Zell-Zielstrukturen sowie der limitierten Verfügbarkeit von Patientenblut wurde pro Protein nur ein 50-mer Peptid synthetisiert. Für den Fall, dass ein Protein mehrere potentielle Sequenzbereiche aufwies, wurde jeweils nur das erfolgversprechendste Peptid ausgewählt und in immunologischen Untersuchungen validiert bzw. im IFN- γ ELISpot Assay dazu genutzt, spontane T-Zell-vermittelte Immunantworten nachzuweisen.

4.2 Bestimmung der Immunogenität potentieller TAA-Kandidaten

Wie bereits beschrieben, besitzt das menschliche Immunsystem die Fähigkeit, durch gezielte Erkennung von TAAs Tumorzellen spezifisch zu bekämpfen (Andersen *et al.*, 2001; Ahmed *et al.*, 2010; Coulie *et al.*, 2014). Auf diesem Dogma beruht die Erprobung von Immuntherapien. Durch die Identifizierung von TAAs, die zu einer spontanen T-Zellantwort führen, ergeben sich therapeutische Möglichkeiten, das Immunsystem gezielt gegen den Tumor zu richten bzw. zu verstärken. Die Anforderungen in Bezug auf Spezifität und Sensitivität an TAAs sind dabei jedoch sehr hoch (Cheever *et al.*, 2009). Im folgenden Abschnitt wurde daher die Immunogenität der potentiellen TAA-Kandidaten ausführlich untersucht.

4.2.1 Bestimmung der Immunogenität im Ursprungspatienten

Mittels IFN- γ ELISpot Assays wurde zuerst die Immunogenität ausgewählter Kandidatenproteine in den Ursprungspatienten überprüft. Hierfür wurden dendritische Zellen der Patienten mit den jeweiligen potentiellen TAA-Kandidaten beladen und dazu genutzt, autologe T-Zellen zu stimulieren. Die Bestimmung der Immunogenität in den Ursprungspatienten ergab ein heterogenes Ergebnis mit unterschiedlich starken T-Zellantworten (Abbildung 8). Während die synthetisierten 50-mer Peptide in den Patienten NCH1150 (Abbildung 8, A) und NCH1390 (Abbildung 8, C) eine bis zu 6-fach erhöhte T-Zell-vermittelte Immunantwort auslösten, erreichten die Patienten NCH519a (Abbildung 8, B) bzw. NCH612 (Abbildung 8, D) nur eine T-Zellantwort, die maximal 1- bzw. 2-fach über der Negativkontrolle (IgG) lag. Besonders die Patienten NCH1150 (Nachweis von T-Zell-vermittelte Immunantworten gegen 12 von 24 Peptiden) und NCH1390 (11 von 24) zeigten deutlich mehr T-Zell-vermittelte Immunantworten auf die getesteten 50-mer Peptide, als vergleichsweise NCH519 (1 von 17) und NCH612 (2 von 17). Für weitere immunologische Untersuchungen wurden nur immunogene 50-mer Peptide in Betracht gezogen, die zu einer mindestens 1,3xfach erhöhten (graue Balken, n = 26) T-Zell-vermittelten Immunantwort geführt hatten. Darunter befanden sich 20 Antigene, deren T-Zell-vermittelte Immunantwort signifikant (graue Balken mit Sternchen) höher als die Negativkontrolle waren.

Die Testung in NCH1150 ergab insgesamt 12 immunogene 50-mer Peptide, deren Potential, spontane T-Zell-vermittelte Immunantworten auszulösen sich im Ursprungspatienten bestätigen lies. Dazu gehör-

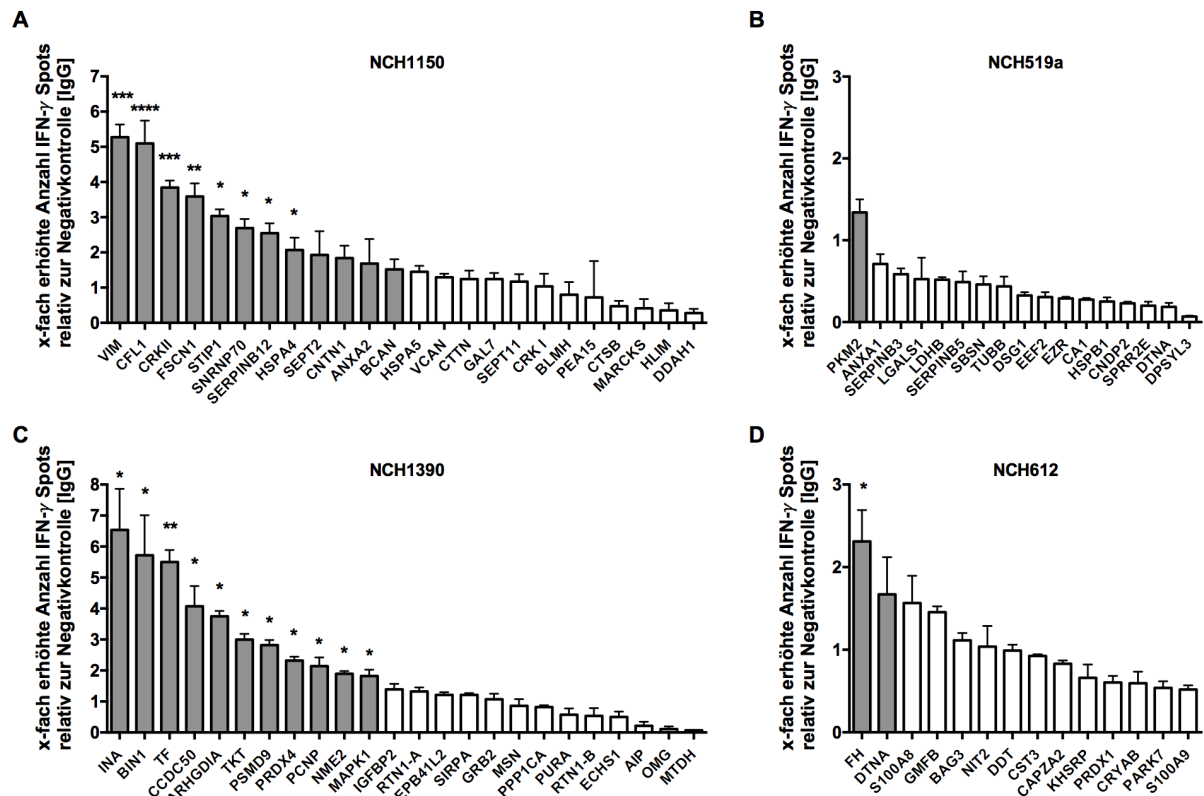


Abbildung 8: Bestimmung der Immunogenität potentieller TAA-Kandidaten in den Ursprungspatienten: **A** NCH1150, **B** NCH519a, **C** NCH1390 und **D** NCH612. Die T-Zell-vermittelte Immunantwort ist in allen vier Abbildungen relativ zur Negativkontrolle (IgG), als erhöht (graue Balken) bzw. signifikant erhöht (graue Balken mit Sternchen) dargestellt. Hervorgehobene potentielle TAA-Kandidaten wurden im Verlauf dieser Arbeit weiter validiert bzw. charakterisiert. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

ten neben VIM, CFL1, CRKII, FSCN1, STIP1, SNRNP70, SERPINB12 und HSPA4 auch Antigene wie SEPT2, ANXA2 und BCAN, die zwar eine erhöhte aber nicht statistisch signifikante T-Zell-vermittelte Immunantwort initiierten (Abbildung 8, A).

Durch die Untersuchung im Ursprungspatienten NCH1390 konnten insgesamt 11 immunogene 50-mer Peptide, bestehend aus INA, BIN, TF, CCDC50, ARHGDI1A, TKT, PSMD9, PRDX4, PCNP, NME2 und MAPK1 nachgewiesen werden (Abbildung 8, C).

Des Weiteren konnten T-Zellantworten gegen PKM2 (NCH519a) sowie FH und DTNA (NCH612) in den beiden Patienten mit geringer immunologischer Ansprechrate nachgewiesen werden (Abbildung 8, B+C).

Die Liste potentieller TAA-Kandidaten, die mittels PF2D und IFN- γ ELISpot aus dem Proteom IDH^{mut} LGG-Tumore identifiziert wurden, reduzierte sich somit um 52 Antigene, gegen die keine spontane T-Zellantwort in den Ursprungspatienten nachgewiesen werden konnte.

Die verbleibenden 26 potentiellen TAA-Kandidaten wurden im Weiteren dazu genutzt, die Spezifität der spontanen T-Zellantworten zu bestimmen. Hierbei sollte ausgeschlossen werden, dass neben den

IDH^{mut} LGG-Patienten auch gesunde Probanden eine T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen die korrespondierenden Peptide zeigen.

4.2.2 Bestimmung der Immunogenität in unabhängigen IDH^{mut} LGG-Patienten und gesunden Probanden

Nachdem nun im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, dass die ausgewählten 26 Antigene nachweislich zu einer spontanen T-Zellantwort im Ursprungspatienten führen, erfolgten nun weitere Validierungsschritte. Hierbei wurde überprüft, ob neben den jeweiligen Ursprungspatienten auch weitere IDH^{mut} LGG-Patienten eine T-Zellantwort gegen diese 50-mer Peptide zeigen. Das hierzu verwendete Patientenkollektiv, welches mittels IFN- γ ELISpot Assay untersucht wurde, bestand insgesamt aus 16 IDH^{mut} LGG-Patienten (WHO^o II/III Primärtumoren) der beiden LGG-Subentitäten Astrozytom (n = 9) bzw. Oligodendrogliom (n = 7) (Tabelle 20).

Die Durchführung der entsprechenden ELISpots wurde unter Anleitung von Dr. Slava Stamova (Abteilung Translationale Immunologie, DKFZ) durchgeführt. Standardmäßig wurden die IFN- γ ELISpot Assays, wie in Abbildung 5, B exemplarisch dargestellt, ausgewertet, jedoch zur besseren Veranschaulichung als 2-Farben-Plots abgebildet und verglichen (Abbildung 9, A-B). Die Definition einer „T-Zell-vermittelten Immunantwort“ entsprach dabei einer signifikant ($p < 0,05$) erhöhten IFN- γ Spot-Anzahl relativ zur Negativkontrolle (IgG). Spontane T-Zellantworten gegen die jeweiligen Antigene sind daher graphisch durch eine farbliche Markierung (rot) dargestellt und verdeutlichen die heterogenen immunologischen Ansprechraten der Patienten (weiß: keine bis geringe Immunantwort ($p > 0,05$)).

Während gegen die drei Antigene SEPT2, BCAN und ARHGDI1A keiner der getesteten Patienten im IDH^{mut} LGG-Kollektiv eine spontane Immunantwort zeigte, führten die restlichen 23 Antigene (88,5 %) zu einer T-Zell-Aktivierung in mindestens einem der getesteten Patienten. Die geringste Immunogenität (< 15 %) zeigten dabei PSMD9, INA und TF mit jeweils einem Patient (1/16) und BIN1, ANXA2, MAPK1, SERPINB12, STIP1, VIM, CCDC50 und PRDX4 mit jeweils zwei Patienten (2/16). Es ließen sich sechs Antigene (PKM2, PCNP, FSCN1, FH, HSPA4 und SNRNP70) identifizieren, gegen die 3 von 16 Patienten eine spontane T-Zellantwort aufwiesen. Insgesamt konnte für fünf Antigene eine besonders hohe Immunogenität in IDH^{mut} LGG-Patienten nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei in absteigender Reihenfolge um CRKII (9/16), CFL1 (7/16), CNTN1 (7/16), NME2 (7/16) und TKT (4/16).

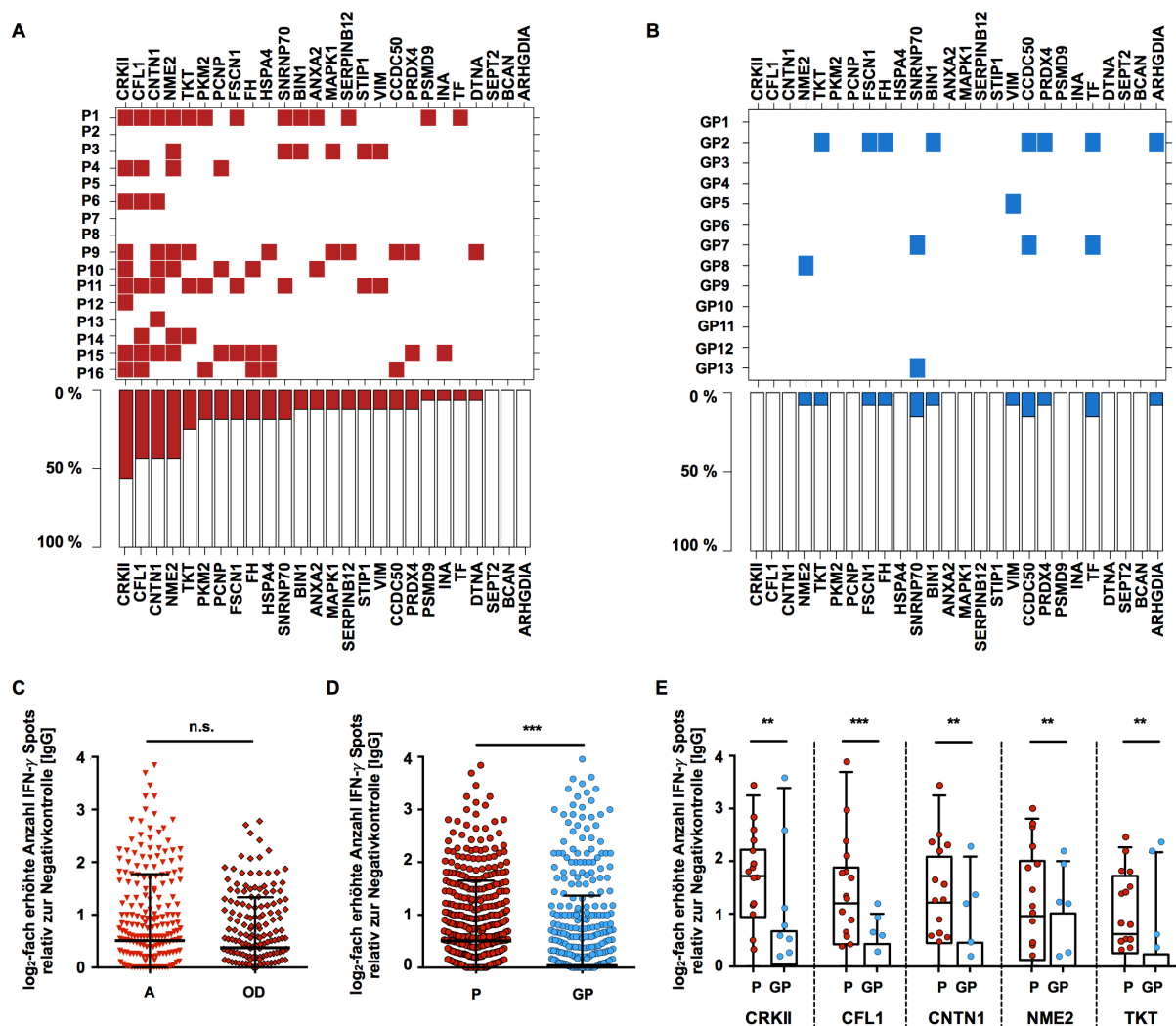


Abbildung 9: **A** Zusammenfassung der Immunogenitätsbestimmung in einem erweiterten IDH^{mut} LGG-Patienten-Kollektiv mittels IFN- γ ELISpot Assay. Zur besseren Vergleichbarkeit der Antigene wurden die Ergebnisse in einem 2-Farben-Plot grafisch dargestellt. Die signifikante T-Zellantwort bzw. eine signifikant erhöhte Anzahl IFN- γ Spots ($p < 0,05$) eines IDH^{mut} LGG-Patienten gegen ein Antigen ist in der Matrix, relativ zur Negativkontrolle (IgG), durch eine rote Markierung dargestellt (weiß: keine bis geringe T-Zell-vermittelte Immunantwort ($p > 0,05$)). **B** Die gleiche Darstellungsform wurde auch für die Auswertung der Ergebnisse in gesunden Probanden ausgewählt. Eine blaue Markierung entspricht hierbei einer signifikant erhöhten T-Zell-vermittelten Immunantwort, während die weißen Flächen keiner bzw. einer geringen Immunantwort ($p > 0,05$) entsprechen. **C** Grafische Darstellung der T-Zell-vermittelten Immunantworten der IDH^{mut} Astrozytome und Oligodendrogliome, um eine Verzerrung der Reaktivität durch den biologischen Unterschied der Subentitäten auszuschließen. **D** Grafische Darstellung aller T-Zell-vermittelten Immunantworten gegen die getesteten Antigene als direkter Vergleich zwischen IDH^{mut} LGG-Patienten und gesunden Probanden. **E** Grafische Darstellung der T-Zell-vermittelten Immunantworten gegen CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT als direkter Vergleich zwischen IDH^{mut} LGG-Patienten und gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. (A, Astrozytom; GP, gesunder Proband; n.s., nicht signifikant; OD, Oligodendrogliom; P, Patient; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$)

Um auszuschließen, dass der biologische Unterschied von astrozytären und oligodendroglialen Tumoren innerhalb des IDH^{mut} LGG-Kollektives zur Verzerrung der Ergebnisse führt, wurden die T-Zellantworten beider Gruppen gesondert betrachtet (Abbildung 9, C). Es zeigte sich jedoch bei beiden eine homogene Verteilung der IFN- γ Spot Anzahlen, sodass sich kein signifikanter Unterschied in der Frequenz sowie in der Höhe der T-Zellantwort erkennen lässt.

Nachdem bestätigt werden konnte, dass neben den Ursprungspatienten auch Patienten in einem erweiterten IDH^{mut} LGG-Kollektiv, unabhängig der LGG-Subentitäten, spontane Immunantworten gegen 23/26 der getesteten potentiellen TAA-Kandidaten aufwiesen, erfolgte nun die Überprüfung möglicher unspezifischer T-Zellantworten in gesunden Probanden. Dieser Schritt war notwendig, um die Spezifität der potentiellen TAA-Kandidaten zu überprüfen. Man geht davon aus, dass gesunde Probanden, die an keinem LGG erkrankt sind oder waren, über keine T-Zell-Gedächtnisfunktion gegen die von uns identifizierten Antigene verfügen. Analog zur Bestimmung der Immunogenität in IDH^{mut} LGG-Patienten wurden PBMCs gesunder Probanden ($n = 13$) im Alter von 32 bis 51 Jahren (Durchschnittliches Alter: 42 Jahre) untersucht (Abbildung 9, B). Eine signifikant erhöhte T-Zellantwort, relativ zur Negativkontrolle (IgG), ist erneut farblich markiert (blau). Während der Großteil (61,6 %) der getesteten potentiellen TAA-Kandidaten keine T-Zellantwort in gesunden Probanden auslösten, führten acht Antigene (NME2, TKT, FSCN1, FH, BIN1, VIM, PRDX4, ARHGDI A) in einem gesunden Probanden bzw. zwei Antigene (SNRNP70, CCDC50) in zwei gesunden Probanden zu einer T-Zell-vermittelten Immunantwort. Bei genauerer Betrachtung dieser Ergebnisse fielen besonders die gesunden Probanden GP2 und GP7 auf, die mit 8/26 respektive 3/26 deutlich häufiger T-Zellantworten gegen die getesteten Kandidaten zeigten als das restliche Patientenkollektiv.

In der direkten Gegenüberstellung der Ergebnisse von IDH^{mut} LGG-Patienten und gesunden Probanden zeichnete sich sowohl quantitativ als auch qualitativ eine signifikant erhöhte Reaktivität ($p < 0,001$) gegen die getesteten Antigene ab (Abbildung 9, D). Dies zeigt sich im Einzelnen auch bei der Betrachtung der 50-mer Peptide CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT, welche die höchsten T-Zellantworten in IDH^{mut} LGG-Patienten ausgelöst haben (Abbildung 9, E).

4.2.3 Identifizierung von CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT als immunogene TAAs

Zur Weiterverfolgung der identifizierten T-Zell-Zielstrukturen wurden, in Anlehnung an die durch das *National Cancer Institute* priorisierten TAA-Eigenschaften (Cheever *et al.*, 2009), folgende Anforderungen an die Immunogenität und die Spezifität der TAA-Kandidaten gestellt:

- Nachweis spontaner Immunantworten in > 25 % der IDH^{mut} LGG-Patienten
- Nachweis spontaner Immunantworten in < 10 % der gesunden Probanden

Basierend auf diesen Kriterien wurden die zuvor beschriebenen Ergebnisse der Immunogenitätsbestimmung in IDH^{mut} LGG-Patienten und gesunden Individuen nun kombiniert betrachtet (Abbildung 9, D-E). Neben signifikant erhöhten T-Zellantworten in IDH^{mut} LGG-Patienten gegenüber gesunden Probanden (Abbildung 9, D) zeichnete sich besonders die hohe und Patienten-spezifische Immunogenität von CRKII ab (56,3 % Patienten / 0 % gesunde Probanden) (Abbildung 9, E). Auch CFL1 und CNTN1 definierten sich durch eine ausschließlich in Patienten auftretende T-Zellantwort (43,8 % Patienten / 0 % gesunde Probanden). Die Stimulation durch die Antigene NME2 und TKT führten zwar auch in einem gesunden Probanden (7,7 %) zu einer T-Zell-vermittelten Immunantwort, jedoch zeigten sie eine deutlich erhöhte Immunogenität in IDH^{mut} LGG-Patienten (43,8 % bzw. 25,0 %). Bezogen auf die Betrachtung der einzelnen Antigene besteht auch hier neben der quantitativen eine qualitativ erhöhte Immunogenität, die in den Antigenen CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT das Signifikanzniveau erreichte (Abbildung 9, E). Basierend auf dieser kombinierten Betrachtung wurden daher die fünf zuvor genannten Antigene als immunogene und bisher unbekannte TAAs mit dem Potential, spontane T-Zellantworten in IDH^{mut} LGG-Patienten hervorzurufen, betrachtet und als solche weiter charakterisiert. Die verbleibenden Antigene, welche zu Immunantworten in < 25 % der IDH^{mut} LGG-Patienten geführt hatten (n = 17), wurden von weiteren Analysen ausgeschlossen.

4.2.4 Bestimmung des Zytokinspektrums TAA-spezifischer T-Zellen

Über den zuvor beschriebenen qualitativen Nachweis spontaner T-Zell-vermittelter Immunantworten hinaus wurde im Folgenden die T-Zell-Aktivierung durch Quantifizierung des Zytokinprofils auf Einzelzellenebene analysiert. Hierfür wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse die Sekretion von Zytokinen auf PBMTCs von IDH^{mut} LGG-Patienten (n = 3) nach Stimulierung mit TAA-beladenen dendritischen Zellen untersucht. Neben dem aktivierungsabhängigen Zytokinspektrum wurden gleichzeitig weitere T-Zell-Oberflächenmarker (CD3, CD4, CD8, CD62L, CD45RA) angefärbt, was die Differenzierung zwischen naiven T-Zellen bzw. T-Gedächtnis- und Effektor-Zellen ermöglichte, jedoch nur in 2/3 Patienten vollständig auswertbar war.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, wurde zwischen einer CD4⁺ (obere Reihe) bzw. CD8⁺ (untere Reihe) T-Zell-vermittelten IFN- γ - und TNF- α - Immunantwort unterschieden. Die durchflusszytometrische Auswertung ist jeweils als repräsentatives Streudiagramm (Abbildung 10, A,C,E,G) und Punktediagramm aller Patienten (Abbildung 10, B,D,F,H) dargestellt.

Es zeigte sich, dass die Sekretion von IFN- γ ausschließlich in < 0,2 % der NME2-stimulierten CD4⁺ (Abbildung 10, B) bzw. CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 10, F) nachgewiesen werden konnte. Gleichzeitig führte die NME2-Stimulation zu einer substantiellen Sekretion von TNF- α , die im Durchschnitt sowohl in 1,0 % der CD4⁺ (Abbildung 10, D) als auch CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 10, H) nachweisbar war. Diese Analyse verdeutlichte ebenfalls eine dominante TNF- α -Sekretion, die bei allen getesteten Antigenen zwischen 0,3 - 1,0 % der CD4⁺ (Abbildung 10, D) aber auch der CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 10, H) lag. Zur genaueren Charakterisierung der immunrelevanten T-Zell-Phänotypen wurde im Weiteren eine Phänotypisierung basierend auf den T-Zell-Oberflächenmarkern CD3, CD4, CD8, CD62L und CD45RA durchgeführt. Die Unterteilung der T-Zell-Phänotypen erfolgte hierbei anhand des Leukozytenmarkers CD45RA und L-Selektin (CD62L) und resultiert in die vier Populationen: naive T-Zellen (T_N: CD62L⁺, CD45RA⁺), Effektor T-Zellen (T_{EFF}: CD62L⁻, CD45RA⁺), Effektor-Gedächtnis T-Zellen (T_{EM}: CD62L⁻, CD45RA⁻) und zentrale Gedächtnis T-Zellen (T_{CM}: CD62L⁺, CD45RA⁻). Hierbei zeigte sich besonders bei CD4⁺ T-Zellen, dass die getesteten Peptide sowohl zu einer starken IFN- γ -, TNF- α - als auch IL-2-

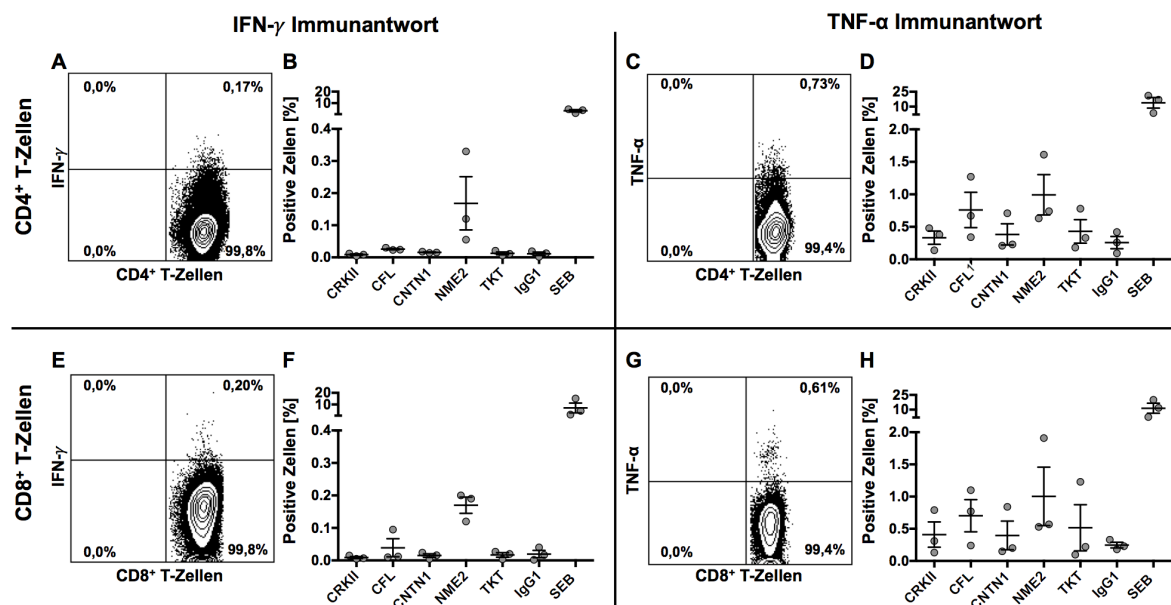


Abbildung 10: Grafische Darstellung des Zytokinspektrums von CD4⁺ T-Zellen (obere Reihe) mit einem Schwerpunkt auf der Sekretion von **A-B** Interferon- γ (IFN- γ) und **C-D** Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) jeweils mit einem repräsentativen Beispiel (Streudiagramm) und dem quantitativen Vergleich der jeweiligen Zytokin-positiven T-Zell-Populationen. Analog dazu wurde die Sekretion von **E/F** IFN- γ und **G/H** TNF- α auch von CD8⁺ T-Zellen (untere Reihe) untersucht und grafisch dargestellt. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM.

Stimulation im Phänotyp der CD62L⁻ und CD45RA⁺ Effektor T-Zellen geführt haben (Abbildung 11, A). Bei den CD4⁺ Effektor-Gedächtnis T-Zellen führte die Antigenstimulation zu einer deutlichen TNF- α -Sekretion. Im Gegensatz dazu zeigten sowohl CD4⁺ naive T-Zellen als auch die CD4⁺ zentralen Gedächtnis T-Zellen, mit Ausnahme von NME2, kaum bzw. keine Sekretion von IFN- γ , TNF- α oder IL-2. Ähnliche Beobachtungen zeigten sich auch bei der Untersuchung von CD8⁺ naiven bzw. zentralen Gedächtnis T-Zellen (Abbildung 11, B). Auch hier führte ausschließlich die Stimulation mit NME2 zu einer geringen Sekretion von IFN- γ , TNF- α und IL-2.

Der Anteil Zytokin-sekretierender CD8⁺ Effektor bzw. CD8⁺ Effektor-Gedächtnis T-Zellen fällt im direkten Vergleich zu den entsprechenden CD4⁺ T-Zell-Phänotypen dagegen deutlich geringer aus.

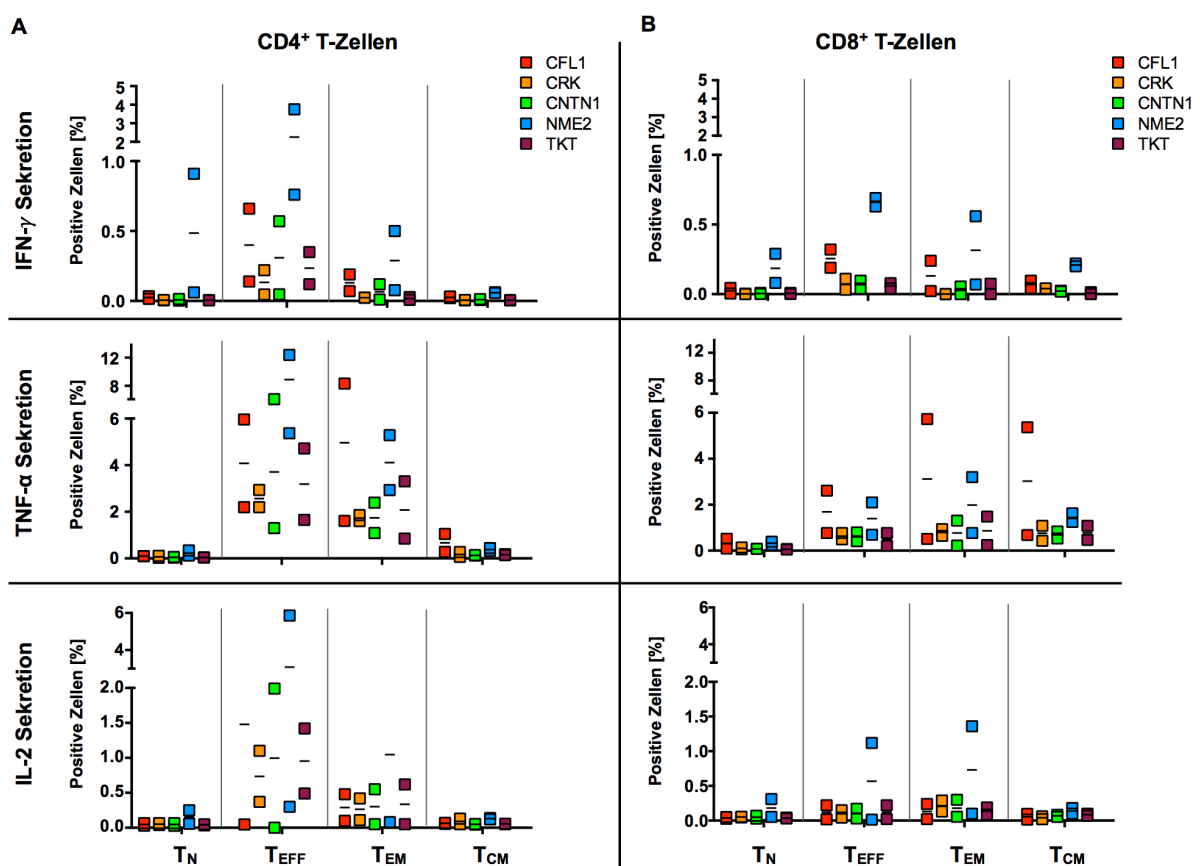


Abbildung 11: Systematische Durchführung einer Mehrfarben-Durchflusszytometrie zur Phänotypisierung von Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-2 (IL-2) sekretierender **A** CD4⁺ und **B** CD8⁺ T-Zellen. Zur Stimulierung der Zytokinsekretion in T-Zellen wurden synthetische Peptide der TAAs CFL1 (rot), CRKII (gelb), CNTN1 (grün), NME2 (blau) und TKT (violett) verwendet. Die Unterteilung der T-Zell-Phänotypen erfolgte hierbei anhand des Leukozytenmarkers CD45RA und L-Selektin (CD62L) und resultiert in vier Populationen: naive T-Zellen (T_N: CD62L⁺, CD45RA⁺), Effektor T-Zellen (T_{EFF}: CD62L⁻, CD45RA⁺), Effektor-Gedächtnis T-Zellen (T_{EM}: CD62L⁻, CD45RA⁻) und zentrale Gedächtnis T-Zellen (T_{CM}: CD62L⁺, CD45RA⁻).

4.3 Charakterisierung der Expressionsstärke immunogener TAAs

4.3.1 mRNA-Expressionsanalysen immunogener TAAs in IDH^{mut} LGGs

Durch die kombinierte Analyse aus PF2D und ELISpot Assay bei IDH^{mut} LGG-Tumoren konnten CFL1, CRKII, CNTN1, NME2 und TKT als immunogene TAAs in IDH^{mut} LGG-Tumoren identifiziert werden, welche in einem umfangreichen Patientenkollektiv nachweislich zu einer signifikanten Anzahl spontaner T-Zell-vermittelter Immunantworten geführt haben. Um die Expression der TAAs auf mRNA-Ebene in einem größeren Datensatz und unter Berücksichtigung verschiedener Gliomsubtypen untersuchen zu können (Abbildung 12), wurde auf den öffentlich verfügbaren genomischen Datensatz niedriggradiger Gliome des TCGA-Konsortiums zurückgegriffen (Brat *et al.*, 2015). Die genomische Klassifizierung von IDH^{mut} LGGs (n = 223) erfolgte anhand des Verlustes der Allele 1p/19q (LOH1p/19p) in die Suben-

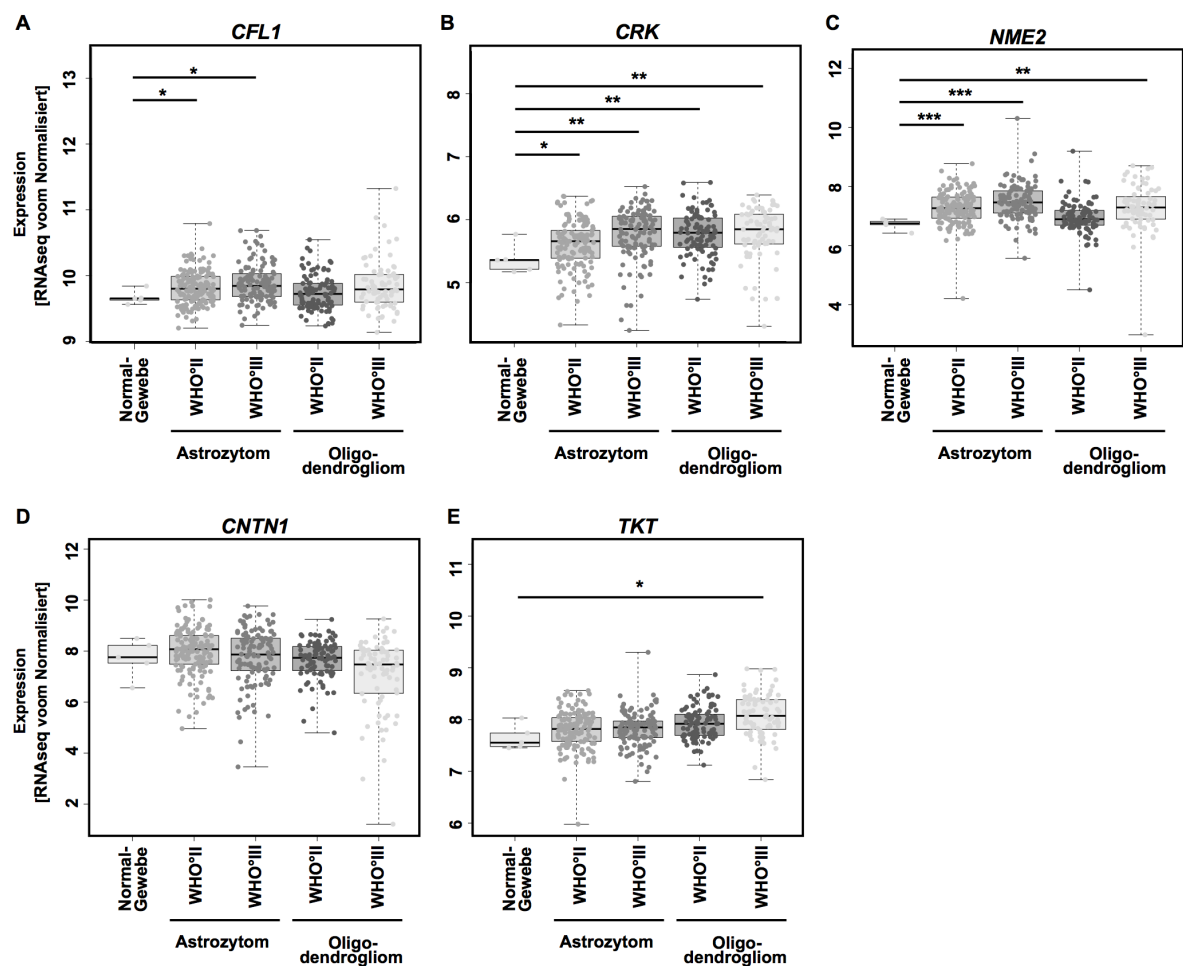


Abbildung 12: Array-basierte Genexpressionsanalysen (LGG-Daten der TCGA) der Gene **A** *CFL1* **B** *CRK* **C** *NME2* **D** *CNTN1* und **E** *TKT* in den Tumorentitäten Astrozytom und Oligodendrogliom (WHO°II und WHO°III) im Vergleich zu normalen Hirngeweben. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM. (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$)

titäten Astrozytom (LOH1p/19p negativ, n = 139) und Oligodendrogliom (LOH1p/19p positiv, n = 84). Zu Vergleichszwecken wurden Genexpressionsdaten für normale (nicht-maligne) Hirngewebe aus dem TCGA-Datensatz der GBMs extrahiert (n = 5) (Brennan *et al.*, 2013).

Die Analyse von astrozytären und oligodendroglialen Tumoren (WHO[°]II und WHO[°]III) zeigte ein signifikant erhöhtes Expressionslevel der Gene *CRK* (resultiert proteomisch in die Isoformen CRKI, CRKII und CRKIII) und *NME2* (ausschließlich Oligodendrogliom, WHO[°]II) (Abbildung 12). Während eine signifikant erhöhte Genexpression für *CFL1* allerdings nur in Astrozytomen (WHO[°]II und WHO[°]III), nicht jedoch in Oligodendrogliomen nachgewiesen werden konnte, zeigte das Gen *CNTN1* vergleichbare Expressionslevel wie die hinzugezogenen normalen Hirngewebe. Auch die Expressionsstärke von *TKT* in den Tumorgeweben zeigt kaum Unterschiede zu normalen Hirngeweben auf und wird nur durch WHO[°]III Oligodendrogliomen signifikant überexprimiert.

4.3.2 Vergleich der TAA-Proteinexpression im Tumorgewebe von IDH^{mut} LGGs und normalen Hirngeweben

Zur Verifizierung der Tumor-spezifischen TAA-Proteinexpression sowie Charakterisierung der subzellulären Lokalisation im Gewebe wurden im Folgenden immunhistochemische Färbungen an einem umfangreichen Kollektiv, bestehend aus normalen Hirngeweben (n = 2) und IDH^{mut} LGG-Tumorgeweben (n = 40) durchgeführt (Abbildung 13). Hierbei wurden jeweils zehn Tumorgewebe der LGG-Subentitäten WHO[°]II und [°]III Astrozytom bzw. WHO[°]II und [°]III Oligodendrogliom verwendet um klassenspezifische bzw. malignitätsabhängige Expressionsunterschiede identifizieren zu können (Abbildung 14). Durch immunhistochemische Färbungen konnte gezeigt werden, dass CFL1 in allen untersuchten IDH^{mut} LGG-Tumorgeweben exprimiert wurde, wobei eine Färbung in normalen Hirngeweben nicht nachweisbar war (Abbildung 13). Im direkten Vergleich zwischen WHO[°]II- und WHO[°]III-LGGs scheint die Expression von CFL1 in Abhängigkeit des WHO-Grades zuzunehmen, auch wenn das Antigen häufig in nur 25-27 % der Tumorzellen nachweisbar war (Abbildung 14). Diese einzeln auftretenden positiven Zellen fanden sich mit vergleichbarer Häufigkeit in Astrozytomen als auch Oligodendrogliomen und wiesen eine sehr starke intrazelluläre sowie zytoplasmatische CFL1-Expression auf.

Das für die zytoplasmatische Signalübertragung wichtige Adaptorprotein CRKII konnte als intrazelluläres Protein nachgewiesen werden (Abbildung 13, B-C). Obwohl die Expression von CRKII in 97,5 % der untersuchten LGG-Tumoren detektierbar war, zeigte sich ausschließlich für Oligodendrogliome eine WHO-Grad-abhängige Expressionszunahme (Abbildung 14).

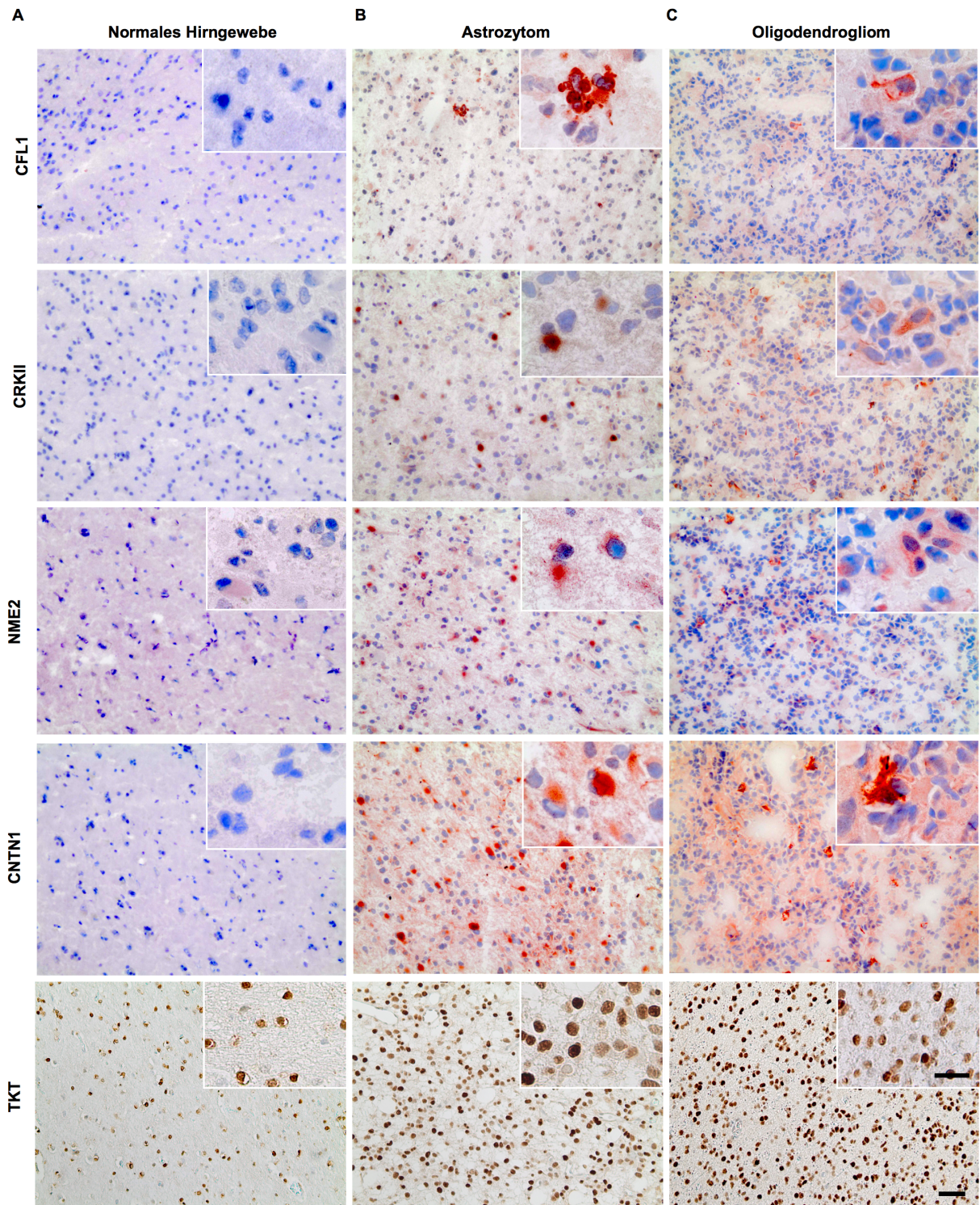


Abbildung 13: Repräsentative Zusammenstellung der immunhistochemischen Untersuchung der Expression von CFL1, CRKII, NME2, CNTN1 und TKT in **A** normalem Hirngewebe sowie in IDH^{mut} LGG-Tumorgeweben, wobei repräsentative Ausschnitte der Tumorentitäten **B** Astrozytom (WHO[°]III) und **C** Oligodendrogliom (WHO[°]III) abgebildet sind. Messbalken = 50 µm, Messbalken-Vergrößerung = 20 µm.

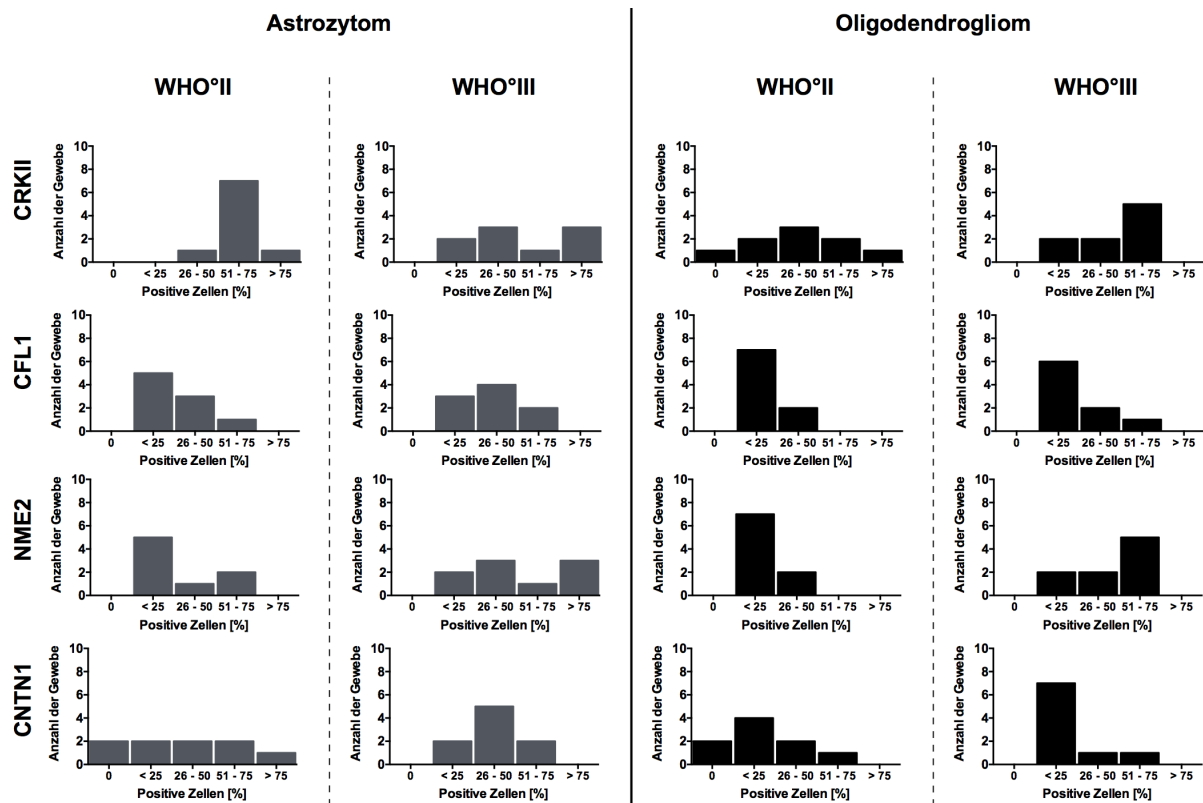


Abbildung 14: Semiquantitative Beurteilung der Proteinexpression von immunogenen Antigenen in IDH^{mut} LGG-Tumorgeweben). Immunhistochemische Färbungen der Antigene CRKII, CFL1, NME2 und CNTN1 in Astrozytomen (WHO°II: n = 10; WHO°III: n = 10) und Oligodendrogliomen (WHO°II: n = 10; WHO°III: n = 10) ermöglichte die Bestimmung Antigen-exprimierender Zellen.

Die Auswertungen aller Färbungen zeigten, dass CRKII zwar Tumor-spezifisch jedoch nicht von allen IDH^{mut} LGG-Tumorzellen exprimiert wird. Eine Expression des Antigens in den untersuchten normalen Hirngeweben war dagegen nicht erkennbar (Abbildung 13, A).

Eine nicht im Normalhirn vorkommende und Tumor-spezifische Expression von NME2 konnte ebenfalls in 100 % beider LGG-Subentitäten bestätigt werden (Abbildung 13). Das Protein wurde hauptsächlich im Zytoplasma der Zellen gefunden, wobei in astrozytären Tumoren tendenziell eine höhere Frequenz positiver Zellen nachgewiesen werden konnte (Abbildung 14).

Auch für CNTN1 konnte eine spezifische Expression im Zytoplasma der Tumorzellen nachgewiesen werden (Abbildung 13). Während in normalen Hirngeweben keine CNTN1-Färbung detektiert wurde, wiesen Astrozytome tendenziell mehr Antigen-positive Zellen auf (Abbildung 14). Hierbei zeigte sich das CNTN1 zwar nur in 80 % der WHO°II LGGs, jedoch in 100 % der untersuchten WHO°III LGGs exprimiert wird.

Immunhistochemische Färbungen bestätigten ebenfalls die nukleäre Expression von TKT in den untersuchten Astrozytom- und Oligodendrogliom-Tumorgeweben, sowie in normalen Hirngeweben (Abbildung 13). Mit Ausnahme von Neuronen ließ sich die Färbung auf beinahe allen Zelltypen im ZNS

nachweisen. Basierend auf der sehr hohen Frequenz an Antigen-positiven Zellen (> 95 %) war daher eine semi-quantitative Auswertung nicht durchführbar.

4.3.3 Bestimmung der TAA-Proteinexpression in IDH^{mut} Stammzell-ähnlichen Gliomzellen

Um die Expression der mittels PF2D und ELISpot Assay identifizierten TAAs spezifisch den Tumorzellen zuordnen zu können, wurden im Weiteren IDH^{mut} GSC-Zelllinien zur Validierung der Antigenexpression verwendet. Diese seltenen Zellmodelle bieten eine einzigartige Möglichkeit, die Tumor-spezifische Expression von CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT an GSCs zu überprüfen bzw. zu quantifizieren. Die verwendeten IDH^{mut} GSC-Zelllinien wurden aus drei sGBM-Tumoren sowie jeweils einem WHO[°]III Oligodendrogliom bzw. einem WHO[°]III Astrozytom isoliert und unter serumfreien Bedingungen kultiviert. In Abbildung 15 sind am Beispiel der repräsentativen GSC-Zelllinie NCH645 die Histogramme zur Quantifizierung von Antigen-positiven Zellen (grün), basierend auf einer adäquaten Isotypkontrolle (grau) bzw. den ungefärbten Zellen (Anhang Abbildung 35) dargestellt. Bei dieser sGBM GSC-Zelllinie konnten die stärkste Expression für CNTN1, mit 82,8 % bzw. für CRKII mit 72,5 % Antigen-positiven GSCs nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu, zeigten die Antigene NME2 (16,7 %), CFL1 (13,1 %) und TKT (4,7 %) eine deutlich geringere Häufigkeit durch GSCs exprimiert zu werden.

Vergleiche zwischen den Gruppen WHO[°]III und WHO[°]IV zeigen für die Antigene CFL1, CRKII, NME2 und CNTN1 eine malignitätsabhängige Expression der Proteine (Tabelle 27). Mit einem durchschnittlichen Auftreten TAA-positiver GSCs ließen sich die Ergebnisse der Antigene in absteigender Reihenfolge wie folgt anordnen: CNTN1 (56,4 %), CRKII (44,5 %), TKT (32,9 %), CFL1 (18,1 %) und NME2 (5,7 %).

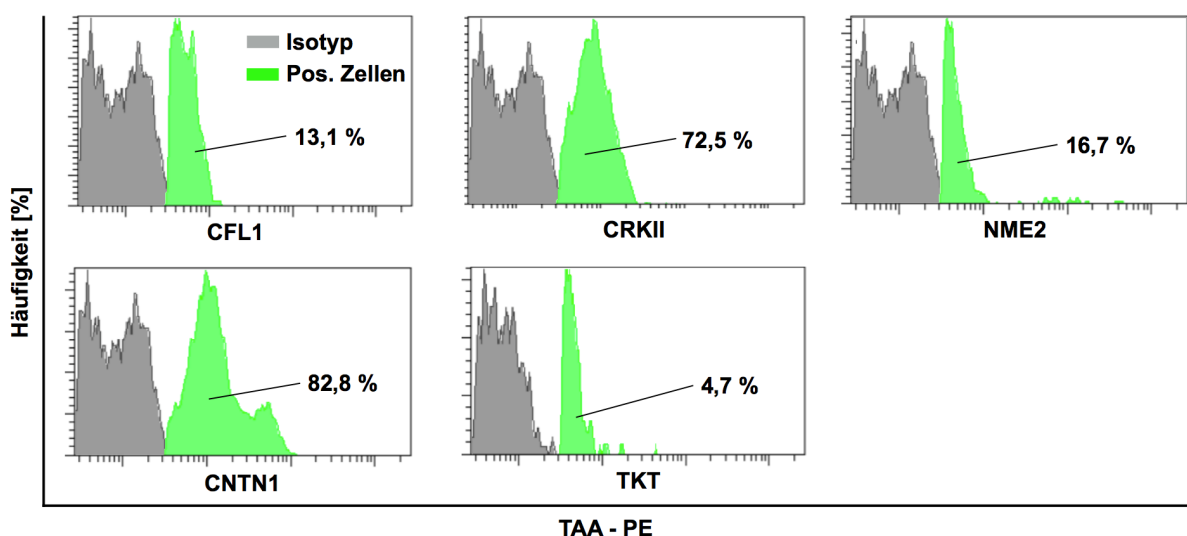


Abbildung 15: Grafische Darstellung der Expression von CFL1, CRKII, NME2, CNTN1 und TKT auf IDH^{mut} GSC-Zelllinien. Die repräsentativen Histogramme der IDH^{mut} sGBM-Zelllinie NCH645 zeigen eine Überlagerung der entsprechenden Isotypkontrolle bzw. der Antigen-exprimierenden IDH^{mut} GSCs.

Tabelle 27: Durchflusszytometrische Validierung der Expression von CFL1, CRKII, NME2, CNTN1 und TKT auf IDH^{mut} GSC-Zelllinien

	NCH551b	NCH612	NCH620	NCH645	NCH1681	Durchschnitt
Histologie	sGBM	OD	sGBM	sGBM	A	
WHO-Grad	IV	III	IV	IV	III	
CFL1*	45,4	1,6	29,9	13,1	0,7	18,1
CRKII*	70,1	12,9	64,6	72,5	2,6	44,5
NME2*	5,2	0,5	0,2	16,7	1,1	5,7
CNTN1*	79,0	19,9	79,7	82,8	20,5	56,4
TKT*	17,4	9,9	47,9	4,7	84,8	32,9

Abkürzungen: A, Astrozytom; OD, Oligodendrogliom; sGBM, sekundäres Glioblastom

* alle Angaben in Prozent [%]

Die vorliegenden Ergebnisse belegen eine zum Teil sehr ausgeprägte Expression der TAAs auf IDH^{mut} GSCs und unterstützen somit deren Eignung als Zielstrukturen in dieser krankheitsrelevanten Tumorzellsubpopulation.

4.3.4 Korrelation der mRNA-Expression immunogener TAAs mit dem Patientenüberleben

Im nächsten Schritt wurde ein möglicher Zusammenhang der mRNA-Genexpression der TAAs mit dem Überleben IDH^{mut} LGG-Patienten untersucht. Hierfür wurde erneut auf den umfangreichen Datensatz IDH^{mut} niedriggradiger Gliome des TCGA-Konsortiums zurückgegriffen (n = 223 Patienten) (Brat *et al.*, 2015). Um die Heterogenität niedriggradiger Gliome aufzulösen und die molekularbiologisch definierten Tumorentitäten individuell zu betrachten, wurden die IDH^{mut} LGG-Tumore für Überlebensanalysen in die Subentitäten Astrozytom (kein 1p/19q LOH, n = 139) bzw. Oligodendrogliom (1p/19q LOH, n = 84) und die entsprechenden WHO-Grade unterteilt. Anschließend wurden für univariate Überlebensanalysen eine Median-basierte Gruppierung der mRNA-Genexpression der immunogenen TAAs vorgenommen und grafisch als Kaplan-Maier-Kurven dargestellt (Abbildung 16).

Wie in Tabelle 28 aufgelistet, zeigten sich für zwei von fünf der untersuchten TAAs signifikante Veränderungen im Patientenüberleben einzelner Gruppen durch eine differenzielle mRNA-Genexpression der Gene. Der deutlichste Unterschied im Überleben der Patienten zeigte sich hierbei für das Gen *NME2*. In der kombinierten Betrachtung der WHO^{°II} und ^{°III} Oligodendrogliome zeigte sich bei einer Überexpression des Gens eine signifikante Verschlechterung des Überlebens ($p = 0,019^*$) (Abbildung 16, A). Durch das Auflösen der WHO-Grade kann dies auf WHO^{°II} Oligodendrogliome zurückgeführt werden ($p = 0,042^*$) (Abbildung 16, A), nicht jedoch auf WHO^{°III} Oligodendrogliome ($p = 0,262$). Neben einer differenziellen Genexpression von *NME2* wies auch *CNTN1* eine Assoziation mit dem Patientenüberleben auf. Hierbei zeigte sich ausschließlich im WHO^{°III} Astrozytom (Abbildung 16, C) und im WHO^{°III} Oligodendrogliom (Abbildung 16, D) eine malignitätsabhängige Verbesserung des Überlebens bei Über-

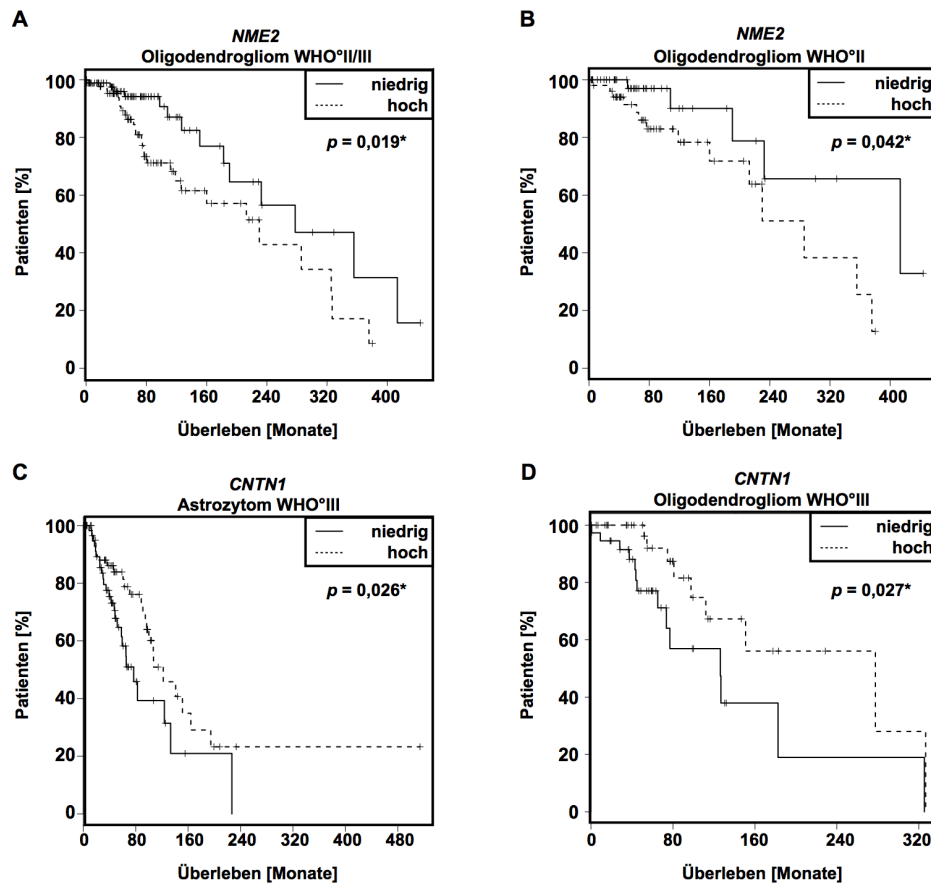


Abbildung 16: Grafische Darstellung signifikanter Zusammenhänge zwischen der mRNA-Genexpression von *NME2* (A-B) und *CNTN1* (C-D) und dem Überleben der IDH^{mut} LGG-Patienten. Zur Auflösung der Heterogenität IDH^{mut} LGGs wurde für die univariaten Analysen zwischen Astrozytomen und Oligodendrogliomen und den entsprechenden WHO-Graden unterschieden (siehe Tabelle 28). Überlebensanalysen (Log-Rank-Test) erfolgten durch Median-basierte Gruppierung der Genexpressionen und sind grafisch als niedrig (< Median, durchgezogene Linie) und hoch (> Median, gestrichelte Linie) dargestellt. (*, $p < 0,05$)

expression des Gens. Die untersuchten Gene *CRK*, *CFL1* und *TKT* erreichten in keiner der molekularbiologisch definierten LGG-Subentitäten eine statistische Signifikanz, die mit einem verbesserten bzw. verschlechterten Krankheitsverlauf assoziiert werden.

Tabelle 28: Tabellarische Auflistung der Assoziation von mRNA-Genexpression der TAAs (Median-gruppert) und dem Gesamtüberleben der IDH^{mut} LGG-Patienten mittels Log-Rank-Test

Diagnose	1p/19q LOH	WHO ^o	Tumor-assoziierte Antigene				
			CRK	CFL1	CNTN1	TKT	NME2
Astrozytom	negativ	II/III	0,212	0,351	0,057	0,254	0,478
Astrozytom	negativ	II	0,956	0,576	0,401	0,975	0,608
Astrozytom	negativ	III	0,567	0,203	0,026*	0,202	0,675
Oligodendrogliom	positiv	II/III	0,176	0,643	0,276	0,815	0,019*
Oligodendrogliom	positiv	II	0,841	0,573	0,378	0,943	0,041*
Oligodendrogliom	positiv	III	0,843	0,861	0,027*	0,396	0,262

(Bedeutung: *, $p < 0,05$)

4.4 *In silico*-Vorhersage potentiell reaktiver Epitope

Nachdem nun in den bisherigen Schritten die Immunogenität von 50-mer Peptidsequenzen, korrespondierend zu mittels PF2D identifizierten Proteinen, in IDH^{mut} LGGs nachgewiesen wurde, bestand das Ziel weiterer Analysen darin, die potentiellen reaktiven Epitope (HLA-Liganden) für zytotoxische T-Zellen der TAAs CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT zu bestimmen. Hierfür wurde erneut auf die Vorhersage-Algorithmen der IEDB-Plattform zurückgegriffen. Im Vergleich zu den zuvor bestimmten und validierten langen Peptiden wurden für weitere Analysen immunogene und natürlich präsentierte Okta-, Nona- und Dekamer-Peptide, die sogenannten reaktiven Epitope der immunogenen 50-mer Proteinsequenzen bestimmt. Durch Verwendung des NetMHCpan-Algorithmus (Ver.2.8) wurden bei der Vorhersage erneut die Schritte der MHC-Klasse-I-Bindewahrscheinlichkeit, TAP-Prozessierung sowie der proteasomale Verdau miteinbezogen (Tenzer *et al.*, 2005). Unter Berücksichtigung der Häufigkeitsverteilung verschiedener HLA-Typen in Deutschland (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2015) wurden Allel-spezifische (HLA-A*02:01-restringiert) reaktive Epitope vorhergesagt und selektiert. Die Vorhersage sowie die Auswahl reaktiver Epitope für die immunogenen TAAs sind im Folgenden ausführlich beschrieben.

4.4.1 Vorhersage HLA-A*02:01-restringierter CFL1-Epitope

Basierend auf der validierten 50-mer Peptidsequenz von CFL1 (Abbildung 17, A) ließen sich unter den 126 potentiellen HLA-A*02:01-restringierten reaktiven Epitopen nur drei Epitope mit einem $IC_{50} < 500$ nM vorhersagen (Tabelle 29). Insgesamt wurden zwei potentielle Bereiche (Anfang: AS 79 und AS 97) für reaktive Epitope identifiziert (Abbildung 17, B-C). Wie in Abbildung 17, A dargestellt, wurden daher drei reaktive Epitope als Oktamer (RE1) bzw. Nonamere (RE2, RE3) ausgewählt (Abbildung 17, B). Der *Total Score* berechnet sich aus der Summe der Einzelwerte für den proteasomalen Verdau, den TAP-Transport und die MHC-Bindewahrscheinlichkeit und spiegelt die Quantität relativ zur Gesamtmenge aller MHC-präsentierten Antigene wider. Hohe Werte entsprechen dabei einer hohen Effizienz innerhalb der einzelnen Prozesse. Die beiden ausgewählten Nonamere (RE2 und RE3) zeigten daher eine bessere Prozessierungs-Effizienz als das Oktamer (RE1) (Abbildung 17, B).

Tabelle 29: Auswahl HLA-A*02:01-restringierter CFL1-Peptide

Bezeichnung	Anfang	Ende	Länge	HLA	Sequenz	Total Score	IC_{50} [nM]
RE1 CFL1	97	104	8-mer	A*02:01	FIFWAPES	-2,44	496,93
RE2 CFL1	97	105	9-mer	A*02:01	FIFWAPESA	-0,38	20,26
RE3 CFL1	79	87	9-mer	A*02:01	ALYDATYET	-0,12	8,14

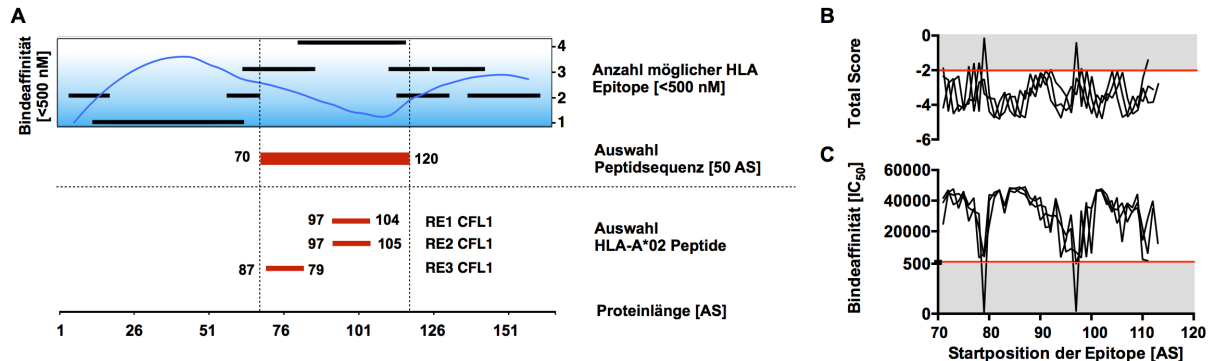


Abbildung 17: **A** Grafische Darstellung der Vorhersage reaktiver Epitope, basierend auf der Proteinsequenz (FASTA-Format) von CFL1 (UniProtKB: P23528). Die mittlere Bindeaffinität über alle HLA-Typen (blaue Linie) verdeutlicht über den Farbverlauf von weiß zu blau eine zunehmende Bindeaffinität. In Kombination mit einer hohen Anzahl möglicher HLA-Epitope ($IC_{50} < 500$ nM) führte dies zur Auswahl eines 50 Aminosäuren (AS) langen Peptids. Die Auswahl HLA-A*02:01-restringierter reaktiver Epitope (8, 9 oder 10 AS - schwarze Linien) innerhalb der validierten 50-mer Peptidsequenz erfolgte durch die Auswahlkriterien (grauer Bereich) einer **B** hohen Prozessierungs- bzw. Präsentierungs-Effizienz (*Total Score*) sowie **C** einer hohen Bindeaffinität ($IC_{50} < 500$ nM).

4.4.2 Vorhersage HLA-A*02:01-restringierter CNTN1-Epitope

Für die 50-mer Peptidsequenz von CNTN1 (Abbildung 18, A) ließen sich keine entsprechenden HLA-A*02:01-Epitope bestimmen, deren $IC_{50} < 500$ nM entsprach (Abbildung 18, B-C). Der geringste IC_{50} -Wert eines für CNTN1 vorhergesagten HLA-A*02:01-restringierten, potentiell reaktiven Epitops beträgt 3.622 nM und liegt damit um ein 7-faches höher als die für die Epitopauswahl definierten Kriterien (Abbildung 18, C). Obwohl eine ausreichende Prozessierungseffizienz gegeben war, wurden keine HLA-A*02:01-Epitope ausgewählt. Basierend auf der Häufigkeitsverteilung unterschiedlicher HLA-Typen in der deutschen Bevölkerung (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2011) wurden alternativ auf HLA-B*07:02- sowie HLA-A*11:01-präsentierte potentiell reaktive Epitope zurückgegriffen. Die in Tabelle 30 aufgeführten potentiellen reaktiven Epitope stellen basierend auf dem IC_{50} -Wert und einer hohen Prozessierungseffizienz die vielversprechendsten Kandidaten dar. Die für CNTN1 vorhergesagten reaktiven Epitope (RE4, RE5, RE6) zeigten keine Sequenzüberlappung miteinander und wurden sowohl als Okatmer- bzw. Nonamer-Peptide synthetisch hergestellt.

Tabelle 30: Auswahl HLA-A*11:01-/B*07:02-restringierter CNTN1-Peptide

Bezeichnung	Anfang	Ende	Länge	HLA	Sequenz	Total Score	IC_{50} [nM]
RE4 CNTN1	633	640	8-mer	B*07:02	SPISKYTI	-0,46	74,45
RE5 CNTN1	620	627	8-mer	A*11:01	SVALTWSR	-0,10	67,23
RE6 CNTN1	643	651	9-mer	A*11:01	KTILSDDWK	-1,01	90,07

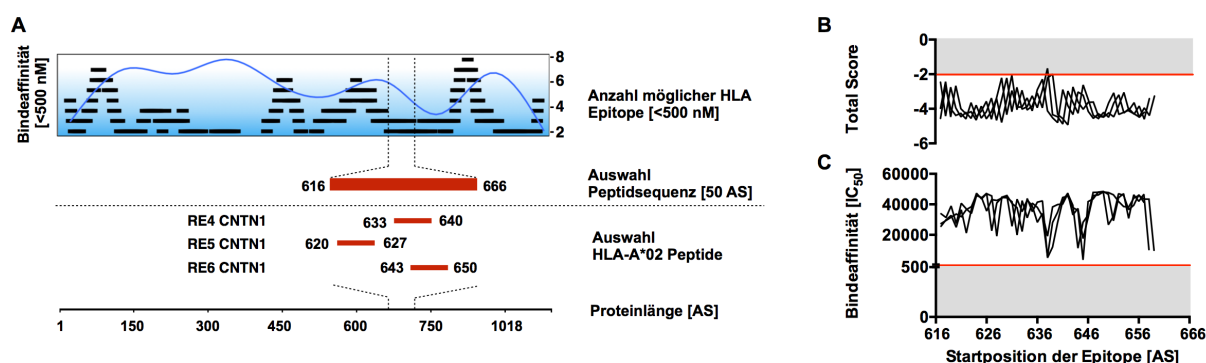


Abbildung 18: **A** Grafische Darstellung der Vorhersage potentieller reaktiver Epitope, basierend auf der Proteinsequenz (FASTA-Format) von CNTN1 (UniProtKB: Q12860). Die mittlere Bindeaffinität über alle HLA-Typen (blaue Linie) verdeutlicht über den Farbverlauf von weiß zu blau eine zunehmende Bindeaffinität. In Kombination mit einer hohen Anzahl möglicher HLA-Epitope ($IC_{50} < 500$ nM) führte dies zur Auswahl eines 50 Aminosäuren (AS) langen Peptids. Die Auswahl HLA-A*11:01-/B*07:02-restringierter reaktiver Epitope (8, 9 oder 10 AS - schwarze Linien) innerhalb der validierten 50-mer Peptidsequenz, erfolgte durch die Auswahlkriterien (grauer Bereich) einer **B** hohen Prozessierungs- bzw. Präsentierungseffizienz (*Total Score*) sowie **C** einer hohen Bindeaffinität ($IC_{50} < 500$ nM).

4.4.3 Vorhersage HLA-A*02:01-restringierter CRKII-Epitope

Wie in Tabelle 31 aufgeführt, wurden für das 50-mer Peptid von CRKII insgesamt vier HLA-A*02:01-restringierte, potentiell reaktive Epitope ausgewählt (Abbildung 19, A). Hierfür standen nach Bestimmung des *Total Scores* und der Bindeaffinität zwei mögliche Bereiche (Anfang: AS 133 bzw. AS 256) zur Verfügung, die den Auswahlkriterien entsprachen (Abbildung 19, B-C). Mit einem Unterschied von nur einer Aminosäure wies das Dekamer RE8 (50,95 nM) eine 15-fach stärkere Bindeaffinität als RE10 (Nonamer) mit 486,18 nM auf (Tabelle 31). Bei der Vorhersage für den zweiten Bereich potentieller Epitope (AS 133) zeigte sich ebenfalls eine stärkere Bindeaffinität des Dekamers (215,12 nM) im Vergleich zum Nonamer (4436,95 nM).

Tabelle 31: Auswahl HLA-A*02:01-restringierter CRKII-Peptide

Bezeichnung	Anfang	Ende	Länge	HLA	Sequenz	Total Score	IC ₅₀ [nM]
RE7 CRKII	234	243	10-mer	A*02:01	LQNGPIYARV	-1,27	215,12
RE8 CRKII	256	265	10-mer	A*02:01	ALALEVGELV	-0,53	50,95
RE9 CRKII	233	241	9-mer	A*02:01	NLQNGPIYA	-1,75	436,95
RE10 CRKII	256	264	9-mer	A*02:01	ALALEVGEL	-0,92	486,18

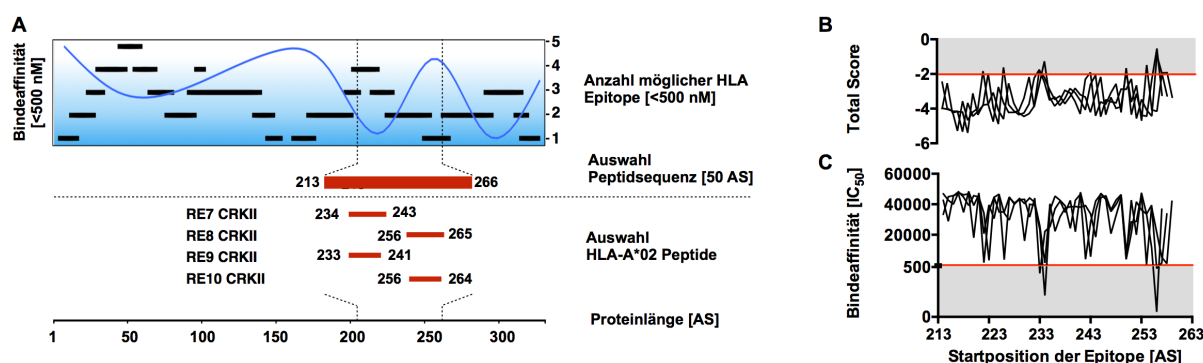


Abbildung 19: **A** Grafische Darstellung der Vorhersage potentiell reaktiver Epitope, basierend auf der Proteinsequenz (FASTA-Format) von CRKII (UniProtKB: P46108). Die mittlere Bindeaffinität über alle HLA-Typen (blaue Linie) verdeutlicht, über den Farbverlauf von weiß zu blau, eine zunehmende Bindeaffinität. In Kombination mit einer hohen Anzahl möglicher HLA-Epitope (IC₅₀ < 500 nM) führte dies zur Auswahl eines 50 Aminosäuren (AS) langen Peptids. Die Auswahl HLA-A*02:01-restringierter reaktiver Epitope (8, 9 oder 10 AS - schwarze Linien) innerhalb der validierten 50-mer Peptidsequenz erfolgte durch die Auswahlkriterien (grauer Bereich) einer **B** hohen Prozessierungs- bzw. Präsentierungseffizienz (*Total Score*) sowie **C** einer hohen Bindeaffinität (IC₅₀ < 500 nM).

4.4.4 Vorhersage HLA-A*02:01-restringierter NME2-Epitope

Auch die Vorhersage der HLA-A*02:01-restringierter potentiell reaktiver Epitope im 50-mer Peptid von NME2 (Abbildung 20, A) ergab zwei eindeutige Bereiche (Abbildung 20, B,C). Sowohl bei AS 68 als auch bei AS 76, ließen sich Okta-, Nona- und Dekamer-Peptide mit einem sehr hohen *Total Score* (alle $\geq -0,39$) und einer hohen Bindeaffinität vorhersagen. Ausgehend von AS 68 wurden daher sowohl Peptide in der Länge 8-, 9- als auch 10-mer für weitere Analysen ausgewählt, da sie alle mit einem IC_{50} -Wert von < 50 nM, eine sehr starke Bindeaffinität aufwiesen (Tabelle 32). Auch für die Peptide RE12 und RE15, die bei AS 76 bzw. AS 77 starteten, zeigten sich mit 44,91 nM bzw. 9,01 nM sehr geringe IC_{50} -Werte. Besonders auffallend waren hierbei die Peptide RE13 und RE15, die neben einer hohen Bindeaffinität auch einen *Total Score* von 0,61 bzw. 0,7 und damit die höchste Prozessierungs-Effizienz aufwiesen.

Tabelle 32: Auswahl HLA-A*02:01-restringierter NME2-Peptide

Bezeichnung	Anfang	Ende	Länge	HLA	Sequenz	Total Score	IC_{50} [nM]
RE11 NME2	68	77	10-mer	A*02:01	YMNSGPVVAM	-0,19	28,99
RE12 NME2	67	85	10-mer	A*02:01	AMVWEGLNVV	-0,05	44,91
RE13 NME2	68	75	8-mer	A*02:01	YMNSGPVV	0,61	8,46
RE14 NME2	68	76	9-mer	A*02:01	YMNSGPVVA	-0,39	40,58
RE15 NME2	77	85	9-mer	A*02:01	MVWEGLNVV	0,70	9,01

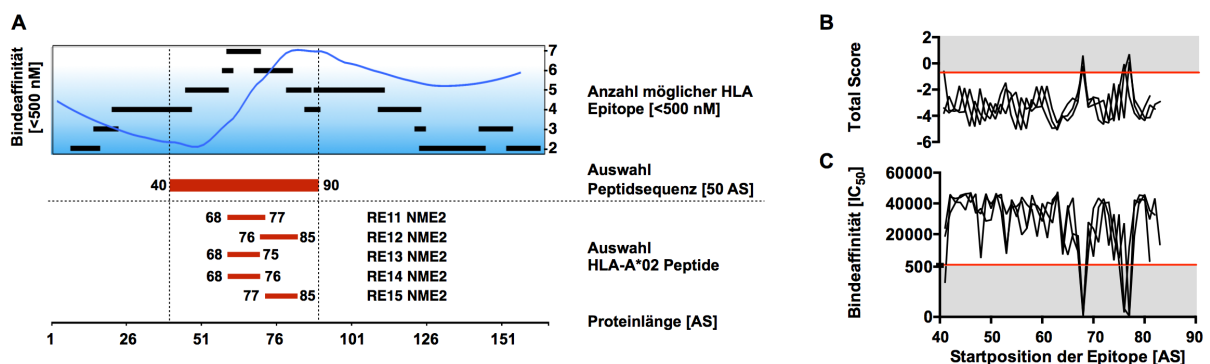


Abbildung 20: **A** Grafische Darstellung der Vorhersage potentiell reaktiver Epitope, basierend auf der Proteinsequenz (FASTA-Format) von NME2 (UniProtKB: P22392). Die mittlere Bindeaffinität über alle HLA-Typen (blaue Linie) verdeutlicht, über den Farbverlauf von weiß zu blau, eine zunehmende Bindeaffinität. In Kombination mit einer hohen Anzahl möglicher HLA-Epitope ($IC_{50} < 500$ nM) führte dies zur Auswahl eines 50 Aminosäuren (AS) langen Peptids. Die Auswahl HLA-A*02:01-restringierter potentiell reaktiver Epitope (8, 9 oder 10 AS - schwarze Linien) innerhalb der validierten 50-mer Peptidsequenz erfolgte durch die Auswahlkriterien (grauer Bereich) einer **B** hohen Prozessierungs- bzw. Präsentierungs-Effizienz (*Total Score*) sowie **C** einer hohen Bindeaffinität ($IC_{50} < 500$ nM).

4.5 Bestimmung der HLA-Ambiguität bei IDH^{mut} LGG-Patienten

Zum Nachweis einer HLA-A*02-restringierten T-Zellantwort wurde durch die Arbeitsgruppe von Dr. Sabine Scherer (Abteilung für Transplantations-Immunologie, Universitätsklinikum Heidelberg) bei allen Patienten, eine HLA-Typisierung durchgeführt. Das Blut der IDH^{mut} LGG-Patienten im vorliegenden Kollektiv wurde teilweise wie bereits in Kapitel 4.2 beschrieben dazu verwendet, die Immunogenität potentieller TAA-Kandidaten zu überprüfen und zeigte im Zuge dessen bereits T-Zell-vermittelte Immunreaktionen gegen einzelne TAAs. Das Kollektiv wurde zusätzlich um IDH^{mut} LGG-Patienten erweitert, von denen eine ausreichende Menge PBMCs für immunologische Untersuchungen zur Verfügung stand. Eine patientenspezifische Auflistung aller HLA-Merkmale sowie der klinischen Diagnose des jeweiligen IDH^{mut} LGG-Patienten findet sich in Tabelle 34. Wie für die kaukasische Population bereits beschrieben (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2015), tritt auch im vorliegenden Patientenkollektiv die Allelgruppe A*02 (38,9 %) vorherrschend auf. Mit absteigender Häufigkeit ließen sich die Ambiguitäten A*24 (27,8 %) sowie A*01, A*03, A*29 (22,2 %) und A*23 (11,1 %) identifizieren. Weitere HLA-A-Allelgruppen wurden nur in maximal einem Patienten nachgewiesen (Abbildung 22, A). Die häufigste Ambiguität der HLA-B-Allelgruppe bildeten B*51 bzw. B*57 (22,2 %). Bei weitere Allelgruppen, die mehrfach nachgewiesen werden konnten, handelte es sich um B*18, B*27, B*35, B*44 (16,7 %) sowie B*08, B*13, B*14, B*15 (11,1 %). Die restlichen Ambiguitäten wiesen mit nur 5,6 % eine geringe Häufigkeit auf (Abbildung 22, B). Das vorliegende IDH^{mut} LGG-Patientenkollektiv wurde somit genutzt, um die Spezifität der Peptide im Bezug auf HLA-A*02-restringierte T-Zell-vermittelte Immunantworten in HLA-A*02-positiven (n = 7) und -negativen (n = 11) Patienten nachzuweisen (Tabelle 34).

Tabelle 34: Bestimmung der HLA-A- und HLA-B-Ambiguität bei IDH^{mut} LGG-Patienten

Patient	Diagnose	HLA-A	HLA-A	HLA-B	HLA-B	HLA-A*02-Status
NCH1000	Oligodendrogliom	02:09	68:02	44:02	53:01	positiv
NCH1247	Oligodendrogliom	02:01	29:02	14:02	51:01	positiv
NCH2411	Astrozytom	02:01	24:02	15:01	51:01	positiv
NCH3343	Astrozytom	02:01	NA	27:05	52:01	positiv
NCH3474	Oligodendrogliom	02:01	29:02	18:01	44:03	positiv
NCH3539	Oligodendrogliom	01:01	02:01	18:01	57:01	positiv
NCH3633	Oligodendrogliom	02:01	NA	27:05	41:02	positiv
NCH519a	Astrozytom	01:01	03:01	13:02	55:01	negativ
NCH2370	Astrozytom	01:01	03:01	35:03	57:01	negativ
NCH2531	Astrozytom	03:01	24:02	35:03	51:01	negativ
NCH3211	Oligodendrogliom	26:01	68:01	08:01	27:05	negativ
NCH3387	Oligodendrogliom	24:02	29:02	38:01	44:03	negativ
NCH3532	Astrozytom	24:02	31:01	39:01	57:01	negativ
NCH3534	Oligodendrogliom	03:01	23:01	07:02	15:71	negativ
NCH3537	Astrozytom	25:01	29:02	18:01	44:03	negativ
NCH3625	Oligodendrogliom	01:01	66:01	08:01	14:02	negativ
NCH3660	Oligodendrogliom	23:01	24:02	35:03	51:01	negativ
NCH3737	Oligodendrogliom	30:01	80:01	13:02	57:01	negativ

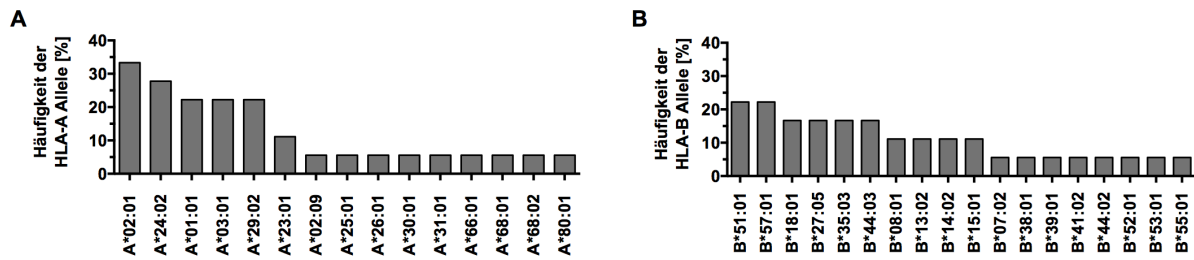


Abbildung 22: Grafische Darstellung der HLA-Ambiguitäten und Häufigkeitsverteilung unterschiedlicher (A) HLA-A- und (B) HLA-B-Allelgruppen im untersuchten IDH^{mut} LGG-Patientenkollektiv.

4.6 Bestimmung der Immunogenität HLA-A*02-restringierter reaktiver Epitope

Die *in silico* vorhergesagten, potentiell reaktiven Epitope wurden im Weiteren mittels IFN- γ ELISpot Assay auf ihre Immunogenität bzw. auf ihr Potential, T-Zellantworten auszulösen, überprüft (Abbildung 23, A). Der Nachweis spontaner Immunantworten durch Antigen-spezifische T-Zellen (PBMCs) deutet auf eine tatsächliche Prozessierung bzw. Präsentation der vorliegenden TAAs im nativen Tumorgewebe hin. Hierzu wurden sowohl HLA-A*02-positive ($n = 7$) als auch HLA-A*02-negative ($n = 11$) IDH^{mut} LGG-Patienten getestet, um die Spezifität der Antigene im Bezug auf eine HLA-A*02-restringierte bzw. eine nicht HLA-A*02-restringierte T-Zell-Aktivierung zu überprüfen. Der Umfang einer T-Zell-vermittelten Immunantwort gegen ein potentiell reaktives Epitop, wie beispielsweise RE7 CRKII (Abbildung 23, B), wurde basierend auf der Anzahl von IFN- γ Spots relativ zur Negativkontrolle (IgG) betrachtet. Zur Qualitätssicherung wurden als Positivkontrollen die Peptide CMV+AdV bzw. SEB eingesetzt (Abbildung 23, C). Die Durchführung der IFN- γ ELISpot Assays sowie die Auswertung der Platten erfolgte mit freundli-

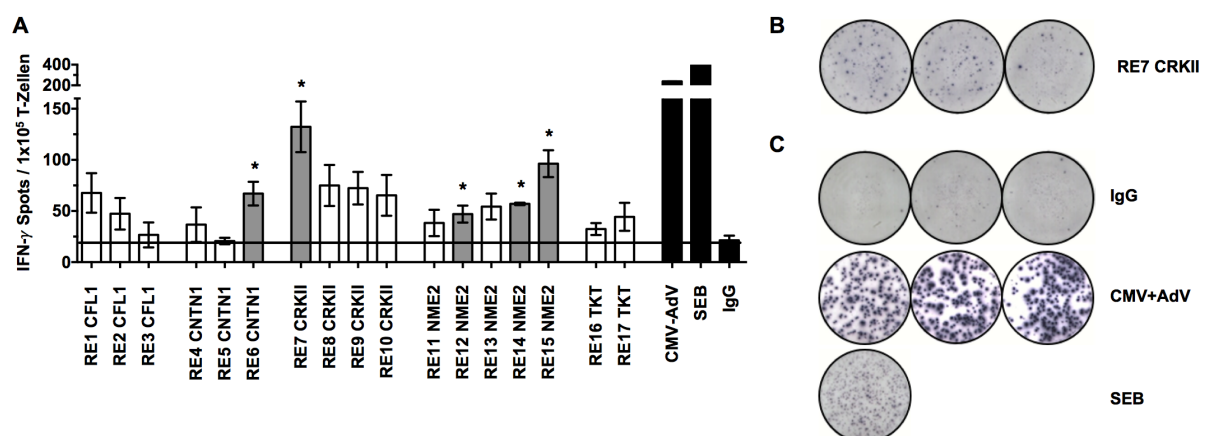


Abbildung 23: Validierung der potentiell reaktiven Epitope durch IFN- γ ELISpot Assays. **A** Repräsentative Auswertung eines IFN- γ ELISpot Assays (NCH1000). Die im Säulendiagramm dargestellten Werte resultieren aus der Anzahl an IFN- γ Spots der getesteten **B** potentiell reaktiven Epitope, bspw. RE7 CRKII, sowie **C** den negativen (IgG) und positiven Kontrollpeptiden (CMV+AdV, SEB). (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$)

cher Unterstützung von Dr. Slava Stamova (Abteilung Translationale Immunologie, DKFZ).

4.6.1 Bestimmung der Immunogenität reaktiver Epitope in HLA-A*02-positiven Patienten

Wie in Abbildung 24 dargestellt, wurden insgesamt 17 potentiell reaktive Epitope der zuvor validierten immunogenen TAAs an sieben Patienten mit einem positiven HLA-A*02-Status getestet. Während die vorhergesagten, potentiell reaktiven Epitope RE1, RE2 und RE3 CFL1 bzw. RE5 und RE6 CNTN1 keine bzw. nur geringe T-Zellantworten auslösten (mit Ausnahme von RE4 CNTN1 = 1/7) (Abbildung 24, A), führten die verbleibenden drei TAAs zu einer signifikant erhöhten IFN- γ -Sekretion der T-Zellen (Abbildung 24, A-B). Die *in silico* bestimmten Epitope für die TAAs CRKII und NME2 führten durchschnittlich in 3/7 IDH^{mut} LGG-Patienten zu einer signifikant erhöhten T-Zellantwort. Mit absoluten IFN- γ Spot-Zahlen, die bis zu einem 5-fachen über der Negativkontrolle (IgG) lagen, ließen die reaktiven Epitope von CRKII und NME2 ihr immunogenes Potential erkennen, spontane T-Zellantworten hervorzurufen. Besonders auffallend war hierbei RE10 CRKII, welches mit einer immunologischen Ansprechrate von 4/7 das reaktive Epitop mit der höchsten Immunogenität in HLA-A*02-positiven IDH^{mut} LGG-Patienten repräsentiert (Abbildung 24, A). Im Gegensatz dazu wurden für die beiden getesteten potentiell reaktiven Epitope RE16 TKT und RE17 TKT kaum signifikant erhöhte T-Zell-vermittelte Immunantworten nachgewiesen (beide in nur 1/7 Patienten).

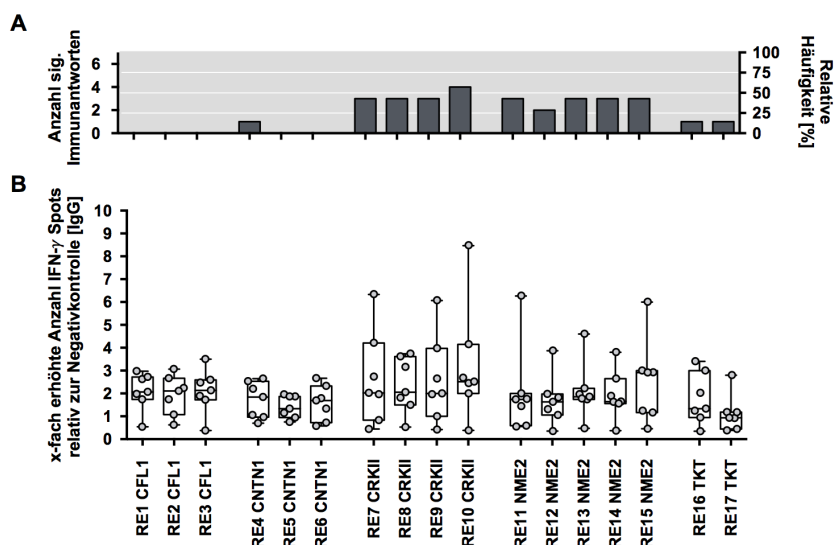


Abbildung 24: Zusammenfassung der Immunogenitätsvalidierung der potentiell reaktiven Epitope in IDH^{mut} HLA-A*02-positiven LGG-Patienten. **A** Quantifizierung signifikanter (sig.) T-Zell-vermittelter Immunantworten sowie Darstellung der relativen Häufigkeit in Prozent, relativ zur Negativkontrolle (IgG). **B** Grafische Darstellung der T-Zell-vermittelten Immunantworten bzw. der Anzahl von IFN- γ Spots gegen die reaktiven Epitope. Angegeben ist der Mittelwert, die *Whiskers* beinhalten die minimalen bzw. maximalen Werte.

4.6.2 Bestimmung der Immunogenität reaktiver Epitope in HLA-A*02-negativen Patienten

Die gleiche Auswahl potentiell reaktiver Epitope wurde im Weiteren dazu genutzt, um die nicht HLA-A*02-restringierte Immunogenität in IDH^{mut} LGG-Patienten zu überprüfen. Es zeigte sich, dass die für HLA-A*02 entworfenen reaktiven Epitope auch durch andere Ambiguitäten präsentiert werden und zu einer Stimulierung Antigen-spezifischer T-Zellen führen können. Ähnlich wie bei HLA-A*02-positiven Patienten zeigten auch die Patienten mit einem negativen HLA-A*02-Status keine bzw. nur sehr wenige signifikant erhöhte T-Zellantworten gegen die potentiell reaktiven Epitope der TAAs CFL1 und CNTN1 (Abbildung 25, A). RE3 CFL1 führte in zwei Patienten zu einer leicht erhöhten T-Zell-vermittelten IFN- γ -Produktion (Abbildung 25, A-B). Auch RE5 CNTN1 wies darauf hin, dass es sich hierbei nicht um ein reaktives Epitop des immunogenen TAA CNTN1 handelt. Signifikant erhöhte spontane T-Zell-vermittelte Immunantworten konnten immerhin in ein bzw. zwei Patienten für die potentiell reaktiven Epitope RE1 CFL1, RE4 und RE6 CNTN1 bzw. RE2 CFL1 nachgewiesen werden. Das immunogene Potential der *in silico* bestimmten reaktiven Epitope von CKRII, NME2 un TKT konnte daher auch in einer nicht HLA-A*02-restringierten Stimulierung von T-Zellen gezeigt werden.

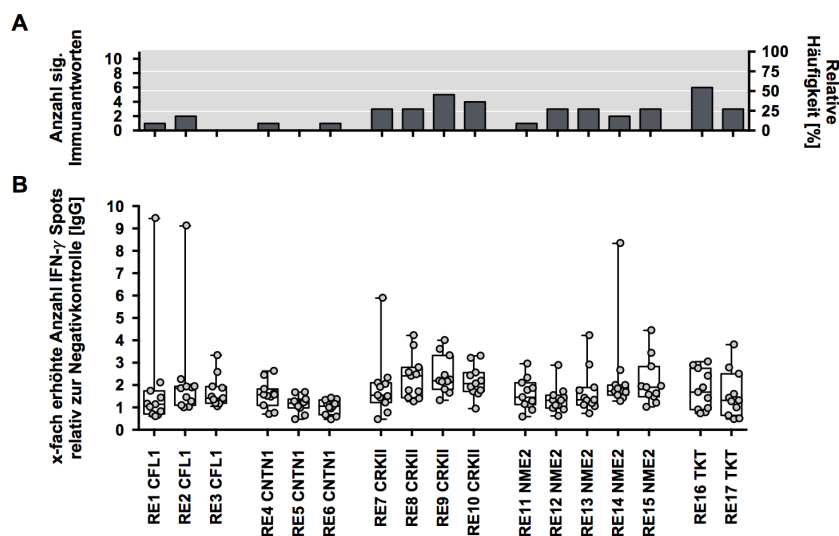


Abbildung 25: Zusammenfassung der Immunogenitätsvalidierung der potentiell reaktiven Epitope in IDH^{mut} HLA-A*02-negativen LGG-Patienten. **A** Quantifizierung signifikanter (sig.) T-Zellantworten sowie Darstellung der relativen Häufigkeit in Prozent, relativ zur Negativkontrolle (IgG). **B** Grafische Darstellung der T-Zellantworten bzw. der Anzahl von IFN- γ Spots gegen die reaktiven Epitope. Angegeben ist der Mittelwert, die *Whiskers* beinhalten die minimalen bzw. maximalen Werte.

4.6.3 Vergleich von HLA-A*02-restringierten gegen nicht restringierte T-Zell-vermittelte Immunantworten

Ungeachtet des HLA-A*02-Status der getesteten IDH^{mut} LGG-Patienten zeigte sich, dass die *in silico* bestimmten, potentiell reaktiven Epitope von CRKII, NME2 und TKT zu einer deutlichen Stimulierung von T-Zell-vermittelten Immunantworten führten. Besonders die reaktiven Epitope RE9 und RE10 CRKII verdeutlichten mit T-Zell-vermittelten Immunantworten in 8/18 Patienten (44,4 %) ihr Potential, Antigen-spezifische T-Zellen zu stimulieren bzw. zu aktivieren. Des Weiteren führten die reaktiven Epitope von CRKII (RE7 und RE8) sowie alle getesteten reaktiven Epitope von NME2 und TKT in 22,2 - 38,9 % der Fälle zu einer signifikant erhöhten T-Zellantwort. Die reaktiven Epitope von CFL1 und CNTN1 hingegen zeigten kein bzw. nur ein sehr schwaches Potential, T-Zellen zu stimulieren (Abbildung 26, A). Ein Trend bzgl. der Zuordnung von HLA-A*02-restringierten bzw. nicht HLA-A*02-restringierten T-Zellantworten in Betrachtung einzelner reaktiver Epitope ist nicht erkennbar (Abbildung 26, B). Auch der direkte Vergleich der totalen IFN- γ Spot-Zahlen der beiden Gruppen HLA-A*02-positiver bzw. -negativer Patienten zeigte keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 26, C).

Mit einem besonderen Fokus auf die signifikant erhöhten T-Zell-vermittelten Immunantworten zeigte sich bei genauerer Betrachtung der Quantifizierung in der Gruppe der HLA-A*02-positiven IDH^{mut} LGG-Patienten signifikant höhere IFN- γ Spot-Zahlen (Abbildung 26, D).

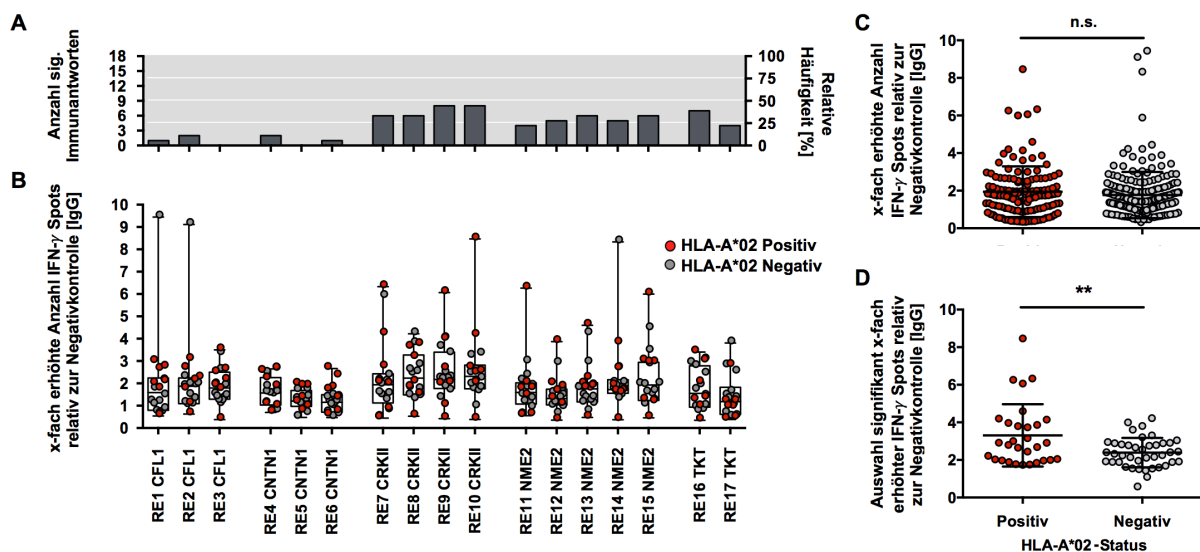


Abbildung 26: Zusammenfassung der Immunogenitätsvalidierung der potentiell reaktiven Epitope in IDH^{mut} HLA-A*02-positiven (rot) und -negativen (grau) LGG-Patienten. **A** Quantifizierung signifikanter (sig.) T-Zellantworten sowie Darstellung der relativen Häufigkeit in Prozent relativ zur Negativkontrolle (IgG). **B** Grafische Darstellung der T-Zell-vermittelten Immunantworten bzw. der Anzahl IFN- γ -Spots gegen die reaktiven Epitope. **C** Vergleich aller T-Zell-vermittelter Immunantworten zwischen HLA-A*02-positiven und -negativen LGG-Patienten. **D** Vergleich der signifikant erhöhten T-Zellantworten zwischen HLA-A*02-positiven und -negativen LGG-Patienten. Angegeben ist der Mittelwert, die *Whiskers* repräsentieren die minimalen bzw. maximalen Werte (B) bzw. das 95 %-Konfidenzintervall (C-D).

4.6.4 T-Zellantworten in Astrozytom- bzw. Oligodendrogliom-Patienten

Um die Verzerrung bzw. die Auswirkung der Tumorentitäten Astrozytom und Oligodendrogliom im Bezug auf Antigen-spezifische Immunantworten zu untersuchen, wurden im folgenden Abschnitt Vergleiche zwischen den beiden Gruppen durchgeführt. Auch hier wiesen alle reaktiven Epitope eine vergleichbare Immunogenität in beiden Entitäten basierend auf den IFN- γ Spot-Zahlen auf (Abbildung 27, A). Bei genauerer Betrachtung bzw. Gegenüberstellung der IFN- γ Spot-Zahlen aller T-Zellantworten (Abbildung 27, B) sowie der ausschließlich signifikant erhöhten T-Zellantworten (Abbildung 27, C) zeigte sich in beiden Fällen eine signifikant höhere Reaktivität in Astrozytomen ($p = 0,008$ bzw. $p = 0,009$).

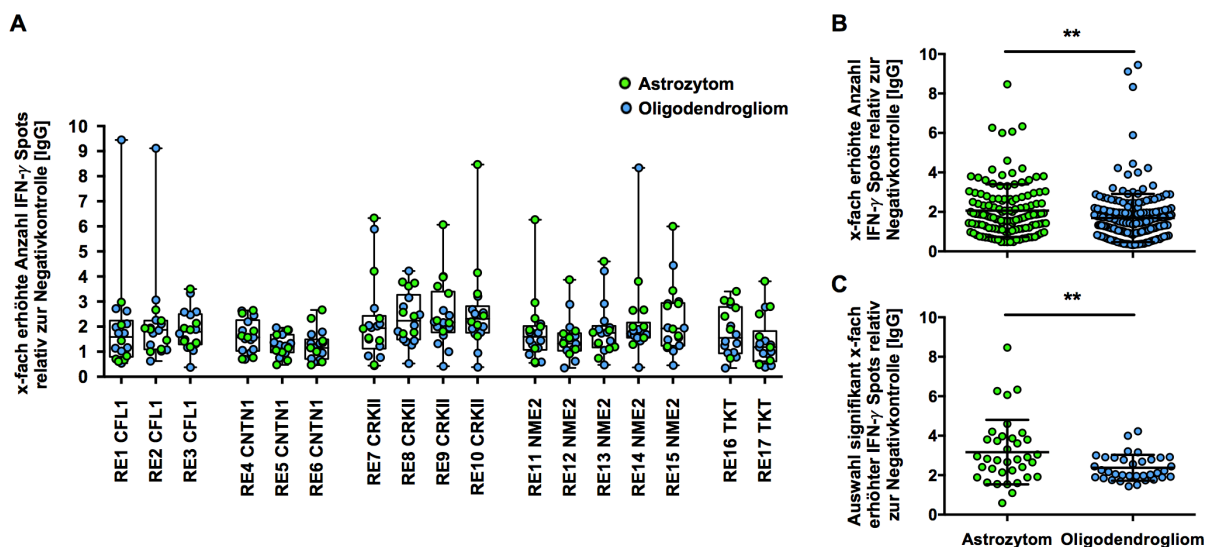


Abbildung 27: Immunogenitätsvalidierung der potentiell reaktiven Epitope in den LGG-Subentitäten Astrozytom (grün) und Oligodendrogliom (blau). **A** Grafische Darstellung der T-Zellantworten bzw. der Anzahl IFN- γ -Spots gegen die reaktiven Epitope. **B** Vergleich aller T-Zellantworten, zwischen HLA-A*02-positiven und -negativen LGG-Patienten. **C** Vergleich der signifikant erhöhten T-Zellantworten zwischen den LGG-Subentitäten Astrozytom und Oligodendrogliom. Angegeben ist der Mittelwert, die Antennen (*Whiskers*) repräsentieren die minimalen bzw. maximalen Werte (A) bzw. das 95 %-Konfidenzintervall (B-C).

Durch die kombinierte Betrachtung der Tumorentität sowie dem HLA-A*02-Status wurde die erhöhte Reaktivität in Astrozytom-Patienten im Weiteren genauer untersucht. Hierbei zeigten sich deutlich signifikant erhöhte T-Zell-vermittelte Immunantworten in HLA-A*02-positiven im Vergleich zu HLA-A*02-negativen Astrozytom-Patienten (Abbildung 28). Der HLA-A*02-Status in Oligodendrogliom-Patienten schien jedoch keine Rolle zu spielen, da keine signifikanten Unterschiede in der Stärke der T-Zellantwort, bzw. der Anzahl an IFN- γ -Spots beider Gruppen erkennbar waren (Abbildung 28).

Während HLA-A*02-positive bzw. -negative Oligodendrogliom-Patienten im Schnitt doppelt so hohe Werte aufwiesen wie die der Negativkontrolle, erreichten HLA-A*02-positive Patienten mit einem Astrozytom relativ betrachtet eine im Schnitt 4-fach höhere Aktivierung der T-Zellen. Maximal führte die Stimulierung mit reaktiven Epitopen in HLA-A*02-positiven Astrozytom-Patienten sogar zu einer 8-fach erhöhten T-Zell-Aktivierung.

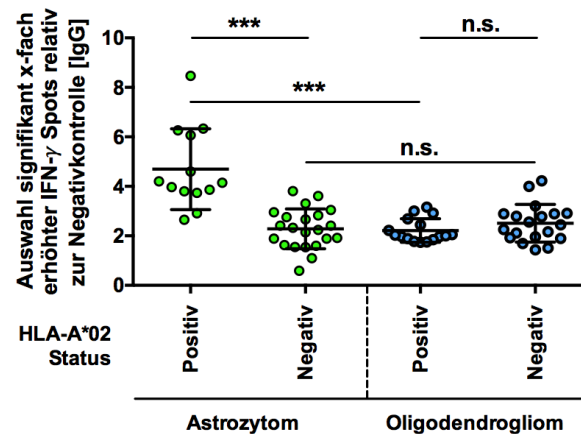


Abbildung 28: Detaillierte Gegenüberstellung der signifikant erhöhten T-Zellantworten IDH^{mut} LGG-Patienten, relativ zur Negativkontrolle (IgG). Die Gruppierung erfolgte sowohl anhand der LGG-Subentitäten Astrozytom (grün) und Oligodendrogliom (blau) als auch anhand des entsprechenden HLA-A*02-Status (positiv und negativ). Angegeben ist der Mittelwert, die *Whiskers* repräsentieren das 95 %-Konfidenzintervall. (n.s., nicht signifikant; ***, $p < 0,001$)

4.6.5 *In silico*-Untersuchung der Promiskuität reaktiver Epitope innerhalb der HLA-Klasse-I-Moleküle

Wie zuvor bereits erwähnt, beschränkt sich die vorliegende Arbeit ausschließlich auf die Identifizierung von TAAs, die mittels MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden. Da die experimentelle Segmentierung von Proteinen oder Peptiden sehr kosten- und zeitintensiv ist, wurden, wie bereits beschrieben, bioinformatische Verfahren zur *in silico*-Bestimmung herangezogen. Basierend auf den Vorhersagealgorithmen der IEDB wurden kurze Peptidsequenzen mit einer effektiven Prozessierungs- sowie hohen Bindewahrscheinlichkeit ausgesucht und ihre Immunogenität mittels IFN- γ ELISpot überprüft. Die Vorhersage potentiell reaktiver Epitope wurde spezifisch auf das Allel HLA-A*02 sowie die Peptidlängen 8-10 AS beschränkt, um die Vorhersageergebnisse zu optimieren. In den vorherigen Abschnitten konnte jedoch gezeigt werden, dass bei keinem der getesteten, potentiell reaktiven Epitope eine ausschließlich HLA-A*02-restringierte Immunogenität nachweisbar war. Das Phänomen promiskuitiver T-Zell-Epitope, d.h. Epitope, die durch eine Vielzahl von HLA-Molekülen präsentiert werden können, verdeutlicht deren

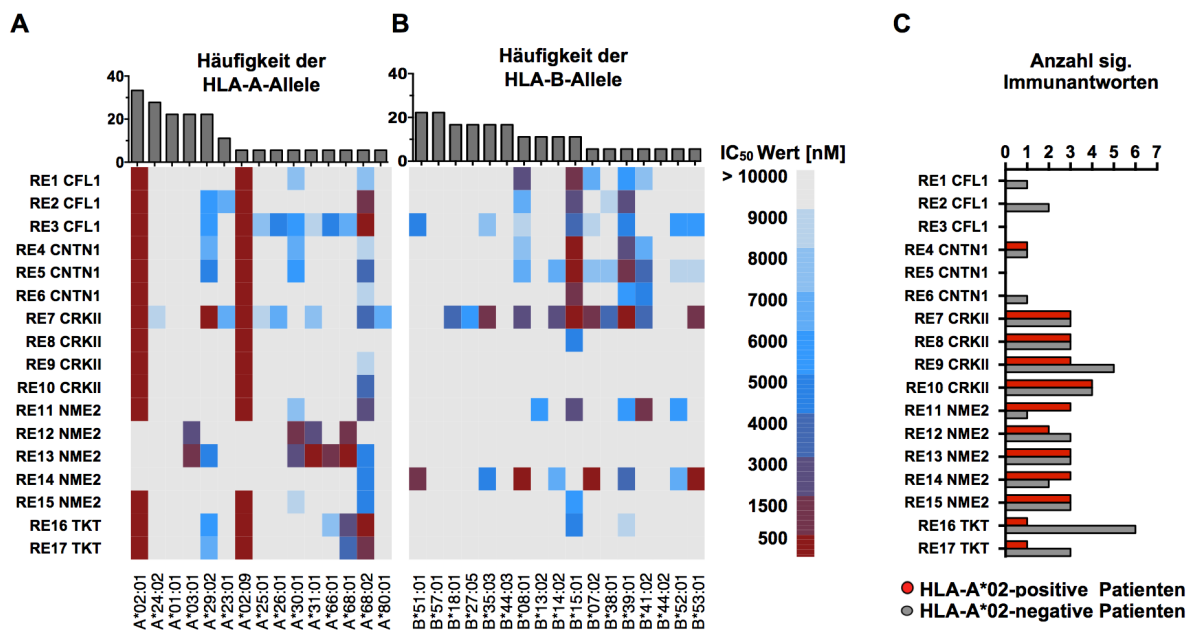


Abbildung 29: Grafische Darstellung der Promiskuität reaktiver Epitope in den im Patientenkollektiv vorkommenden **A** HLA-A- und **B** HLA-B-Ambiguitäten basierend auf deren Häufigkeit. **C** Zusammenfassung signifikanter (sig.) T-Zellantworten in HLA-A*02-positiven bzw. -negativen Patienten gegen die *in silico* bestimmten reaktiven Epitope neuer, mittels PF2D identifizierter TAAs.

besondere Rolle als mögliche T-Zell-Zielstrukturen bei der Entwicklung von Tumor-spezifischen Immuntherapien (Frahm *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2016). Promiskuitive T-Zell-Epitope haben den Vorteil, trotz ethnisch- und länderspezifischer HLA-Polymorphie, ein breites Spektrum der menschlichen Bevölkerung abzudecken. Retrospektiv wurden daher HLA-Allel-spezifische *in silico*-Bindevorhersagen durchgeführt und mit allen im Kollektiv vorkommenden HLA-A- und -B-Ambiguitäten (siehe Tabelle 34) abgeglichen (Abbildung 29, A-B). Die vorhergesagten Bindeaffinitäten der einzelnen reaktiven Epitope (RE1-RE17) wurden für alle im Patientenkollektiv vorkommenden HLA-Ambiguitäten berechnet und sind als farblicher Verlauf mit steigendem IC₅₀-Wert bzw. abnehmender Bindeaffinität in der *Heatmap* dargestellt (Abbildung 29, A). Die Verwendung des IC₅₀-Wert < 500 nM als „universeller“ Grenzwert für die Bindeaffinität der häufigsten HLA-Ambiguitäten ist eine weit verbreitete Methode, die experimentell belegt ist (Paul *et al.*, 2013). Bis auf die reaktiven Epitope von CNTN1, für die keine HLA-A*02-restringierten Epitope nachgewiesen werden konnten, zeigte sich in dieser Darstellungsform bei allen Epitopen jeweils eine hohe HLA-A*02-Bindeaffinität (A*02:01 und A*02:09) (Abbildung 29, A). Neben HLA-A*02 konnten durch diese Untersuchungen allerdings auch weitere HLA-Allele identifiziert werden, welche die getesteten potentiell reaktiven Epitope mit einer hohen Bindeaffinität präsentieren (Anhang Tabelle 37). So zeigte sich beispielsweise, dass HLA-A*29:02, welches in 22,2 % der Patienten vorkommt, das reaktive Epitop RE11 NME ebenfalls mit einem IC₅₀-Wert < 500 nM bindet. Während für die reaktiven Epitope von CRKII kaum alternative HLA-A- oder HLA-B-Allele gefunden werden konnten, zeigte sich für

NME2 das Gegenteil. Nur sehr wenige Allele wie beispielsweise A*01:01, A*03:01, B*57:01, B*44:03, B*13:02 oder B*44:02 wiesen keine Kompatibilität bzw. eine bestimmbar Bindeaffinität (IC_{50} -Wert < 10.000 nM) zu den getesteten reaktiven Epitopen auf. Jedoch zeigten eben diese potentiell reaktiven Epitope beider TAAs vergleichsweise die größte Immunogenität in HLA-A*02-positiven bzw. -negativen Patienten (Abbildung 29, C). Trotz entsprechender Bindeaffinität der potentiell reaktiven T-Zell-Epitope von CFL1 zeigte sich keine HLA-A*02-restringierte T-Zellantwort (Abbildung 29, C). Die mittels IFN- γ ELISpot nachgewiesene nicht HLA-A*02-restringierte Aktivierung von T-Zellen durch RE2 CFL1 resultiert nicht durch ein *in silico* vorhergesagtes HLA-Allel und kann somit nicht durch die vorliegende Analyse erklärt werden. Auch die potentiell reaktiven Epitope von CNTN1, welche im Gegensatz zu CFL1 relativ viele HLA-A- und -B-Alternativen aufwiesen, führten zu keiner bzw. nur zu einer geringen Stimulation signifikanter T-Zellantworten in den IDH^{mut} LGG-Patienten (Abbildung 29, C). Obwohl sich für die Epitope von CNTN1 keine HLA-A*02-Peptide vorhersagen ließen, führte RE4 CNTN1 in 1/7 HLA-A*02-positiven Patienten zu einer signifikanten Immunantwort. Dies beruht auf der hohen Anzahl alternativer HLA-B-Allele, die das RE4 CNTN1 binden. Der HLA-A*02-positive Patient, der gegen RE4 CNTN1 eine signifikante T-Zellantwort zeigte, ist HLA-B*51:01-positiv, welches mit einer starken Bindeaffinität ($IC_{50} < 1.500$ nM) vorhergesagt wurde. Für die potentiell reaktiven Epitope von TKT fanden sich beispielsweise mehr HLA-B- als HLA-A-Alternativen. Obwohl HLA-A*02 die stärkste Bindeaffinität gegen die getesteten reaktiven Epitope RE16 und RE17 TKT aufwies, führten diese in jeweils nur einem Patienten zu einer signifikanten T-Zellantwort. Die umfangreichen T-Zellantworten der HLA-A*02-negativen Patienten sind dagegen hauptsächlich auf HLA-B-Allele (B*08:01, B*15:01, B*39:01 aber auch A*68:01) zurückzuführen.

Durch die bioinformatische *in silico*-Bestimmung von potentiell reaktiven Epitopen der TAAs CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT wurde versucht, die immundominanten Peptidsequenzen der mittels PF2D neu identifizierten TAAs zu bestimmen. Besonders die reaktiven Epitope von CRKII, NME2 und TKT repräsentierten promiskuitive Bereiche mit einem hohen Potential, sowohl HLA-A*02-restringierte als auch nicht HLA-A*02-restringierte T-Zellantworten in IDH^{mut} LGG-Patienten (> 25 %) hervorzurufen. Basierend auf der Häufigkeit, mit der die getesteten Peptide zu signifikanten T-Zellantworten geführt hatten, wurden die Epitope RE10 CRKII (ALALEVGEL), RE15 NME2 (MVWEGLNVV) und RE16 TKT (FLAEAE LLNL) im Weiteren zur Quantifizierung Antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen genutzt.

4.7 Nachweis von Antigen-spezifischen T-Zellen durch HLA-A*02 iTAg-Tetramere

Nach Bestimmung der reaktiven Epitope neuer mittels PF2D identifizierter TAAs, bestand das Ziel weiterer Untersuchungen darin, Antigen-spezifische T-Zellen im peripheren Blut (*Peripheral Blood Mononuclear T cells*, PBMTCs) IDH^{mut} LGG-Patienten mittels HLA-A*02 iTAg-Tetramere *ex vivo* nachzuweisen und zu quantifizieren.

Diese Methode soll unabhängig von ELISpot-Analysen den Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen in IDH^{mut} LGG-Patienten überprüfen und unterstützt somit gegebenenfalls unsere bisherigen Erkenntnisse über die Identifizierung von reaktiven Epitopen neuer immundominanter Antigene. Hierfür wurden individuelle HLA-A*02 iTAg-Tetramere (PE-konjugiert) hergestellt und mit folgenden reaktiven Epitopen beladen (siehe Kapitel 4.6):

- **RE10 CRKII:** ALALEVGEL
- **RE15 NME2:** MVWEGLNVV
- **RE16 TKT:** FLAEAELLNL

Die Detektion von Antigen-spezifischen T-Zellen in PBMTCs ohne vorherige Vakzinierung der Patienten stellt eine große Herausforderung dar, da der Anteil einer solchen Population häufig < 1 % aller zytotoxischen T-Zellen beträgt. iTAg-Tetramere weisen, im Gegensatz zu kommerziell erhältlichen pMHC-Monomeren eine deutlich gesteigerte Stabilität auf, da sie Antigen-spezifische T-Zellen über die gleichzeitige Bindung von mehreren TCRs komplexieren. Zusätzlich beinhaltet das iTAg-Tetramer-System eine patentierte Mutation (A245V) in der schweren Kette der α 3-Domäne des HLA-Klasse-I-Moleküls, welches die Spezifität gegenüber zytotoxischen T-Zellen erhöht und die unspezifische Bindung des

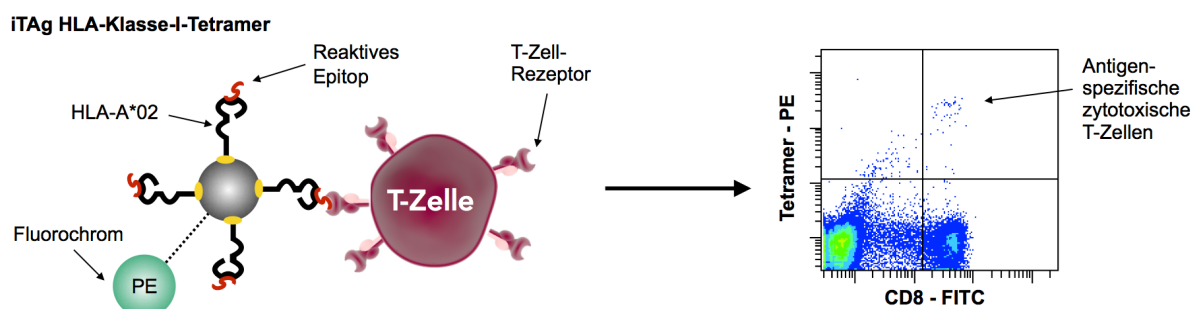


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Quantifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen in IDH^{mut} LGG-Patienten durch Verwendung der iTAg HLA-Klasse-I-Tetramere (individuell gekoppelte HLA-A*02-Moleküle mit den reaktiven Epitopen RE10 CRKII, RE15 NME2 und RE16 TKT). Durch die Verwendung der individuellen iTAg-HLA-Klasse-I-Tetramere können Antigen-spezifische T-Zellen, wie hier schematisch im oberen rechten Quadranten dargestellt, mittels FACS-Sortierung quantifiziert und isoliert werden.

CD8-Rezeptors verhindert. Durch die Konjugation mit dem Fluorochrom PE besteht die Möglichkeit, die Zellen mittels Durchflusszytometrie zu quantifizieren bzw. für weitere Untersuchungen zu isolieren (FACS-Sortierung).

4.7.1 Quantifizierung TAA-spezifischer zytotoxischer PBMTCs in IDH^{mut} LGG-Patienten

Unter Verwendung der zuvor beschriebenen iTAg HLA-Klasse-I-Tetramere (RE10 CRKII: ALALEVGEL, RE15 NME2: MVWEGLNVV, RE16 TKT: FLAEAE LLNL) sollte im Folgenden die Quantität von TAA-spezifischen zytotoxischen PBMTCs in IDH^{mut} LGG-Patienten untersucht werden. Hierfür konnten, basierend auf Ergebnissen der HLA-Typisierungen, sechs HLA-A*02-positive IDH^{mut} LGG-Patienten ermittelt werden von denen ausreichende Mengen PBMCs zur Verfügung standen ($> 1 \times 10^8$ Zellen). Ziel der Untersuchung war es, spezifische T-Zell-Populationen im peripheren Blut nachzuweisen und somit die zuvor beschriebenen ELISpot-Ergebnisse zu überprüfen.

Mittels Durchflusszytometrie wurden durch kombinierte Färbe- und Gatingstrategien der totalen Lymphozytenpopulation sukzessive lebende (PO^-) bzw. einzeln messbare Zellen ausgewählt und im Weiteren auf die Expression des CD3-Markers untersucht (Abbildung 31, A). Zytotoxische T-Zellen ($CD3^+CD8^+$) wurden nach Komplexierung mit einem iTAg HLA-Klasse-I-Tetramer (PE^+) als Antigen-spezifisch erachtet. Zur besseren Darstellung von Antigen-spezifischen zytotoxischen PBMTCs an einem repräsentativen Patienten (NCH1152) wurden basierend auf dieser Gatingstrategie nur die Marker CD8 (AF488) und Tetramer (PE) gegeneinander aufgetragen (Abbildung 31, B). Die Spezifität der Tetramercfärbung wurde durch die Verwendung einer Negativkontrolle (Anhang Abbildung 31, B) sichergestellt und zusätzlich durch Reaktivität gegen Influenza M1 (GILGFVFTL) bestätigt (Median 0,58 %; Standardabweichung 0,39 %) (Abbildung 31, C). Obwohl sich in der Positivkontrolle eine deutliche Population PE^+ zytotoxischer T-Zellen von den restlichen zytotoxischen T-Zellen separierte, konnte dieser Befund bei Testung von mit reaktiven Epitopen beladenen Tetrameren, nicht gleichermaßen eindeutig beobachtet werden. Trotzdem wies die Mehrheit aller HLA-A*02-positiver IDH^{mut} LGG-Patienten eine signifikant erhöhte Population an Antigen-spezifischen PBMTCs auf (Abbildung 31, C). Bei detaillierter Betrachtung konnte in 5/6 Patienten das Vorkommen RE10 CRKII-spezifischer PBMTCs bestätigt werden, deren Frequenz zwischen 0,35 % - 2,05 % bei einem Median von 0,55 % und einer Standardabweichung von 0,65 % auftrat. Ähnliche Werte resultierten ebenfalls bei Betrachtung der Populationen mit einer spezifischen Affinität gegen RE16 TKT (0,20 % - 1,41 %). Mit einer medianen Frequenz von 0,44 % und einer Standardabweichung von 0,45 % wiesen die Patienten auch gegen die RE16 TKT-iTAg HLA-A*02-Tetramere eine solide Population an Antigen-spezifischen T-Zellen auf (0,20 % - 1,41 %).

RE15 NME2 ist nachweislich das Epitop, gegen welches die geringste Quantität an Antigen-spezifischen

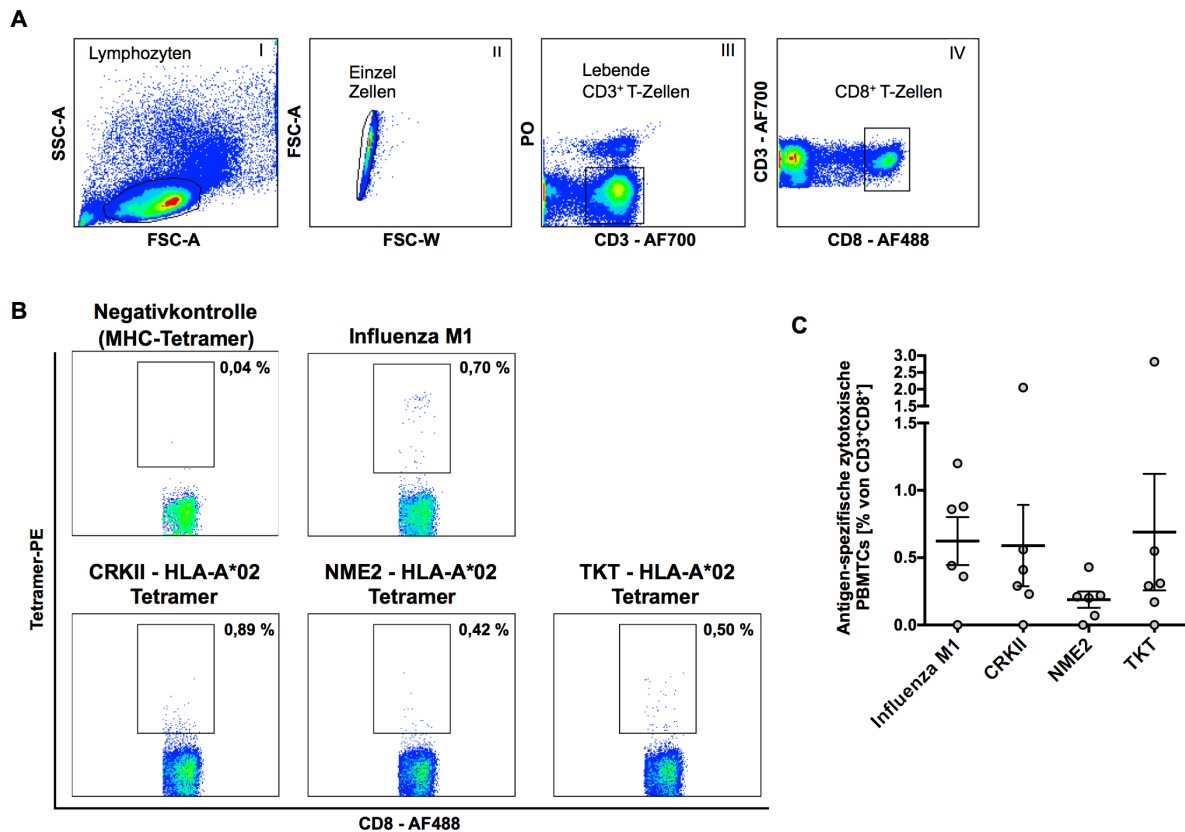


Abbildung 31: **A** Grafische Darstellung der Gatingstrategie zur Bestimmung der (I) Lymphozyten-Population, (II) einzelner Zellen, (III) PO⁻CD3⁺ T-Zellen und (IV) CD3⁺CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. **B** Repräsentatives Streudiagramm spezifischer PBMTCs (NCH1152), die durch die Antigene von Influenza M1, CRKII, MME2 und TKT mit den iTag HLA-A*02-Tetrameren komplexierten. Als Negativkontrolle wurde ein iTag HLA-A*02-Tetramer verwendet, welches kein Antigen enthielt. **C** Quantitativer Vergleich der TAA-spezifischen PBMTC-Populationen der IDH^{mut} LGG-Patienten (n = 6) nach Abzug der Negativkontrolle.

T-Zellen bestimmt werden konnte. Mit einer medianen Frequenz von 0,26 % (Standardabweichung 0,21 %) konnten in 4/6 Patienten Antigen-spezifische zytotoxische PBMTCs mit einer Häufigkeit von 0 % bis 0,56 % nachgewiesen werden. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von PBMCs konnte im Fall von Patient NCH1390 nicht sichergestellt werden, dass eine ausreichende Menge PBMTCs für die Durchflusszytometrie zur Verfügung stand (Anhang Tabelle 38). Zusätzlich führte eine geringe Viabilität der Zellen dazu, dass vergleichsweise weniger PO⁻ Lymphozyten bzw. CD3⁺ und CD8⁺ T-Zellen aufgezeichnet werden konnten, wodurch eine reduzierte Sensitivität der Quantifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen beobachtet wurde. Dies gilt es bei der Beurteilung der Ergebnisse von Patient NCH1390 zu berücksichtigen.

Durch die iTag HLA-Klasse-I-Tetrameranalysen konnten somit in HLA-A*02-positiven IDH^{mut} LGG-Patienten sowohl RE10 CRKII (ALALEVGEL), RE15 NME2 (MVWEGLNVV) sowie RE16 TKT (FLAEAEELLNL) Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden. Diese quantitativen Daten ergänzen somit funktionsunabhängig die Ergebnisse aus den IFN- γ ELISpot Assays der entsprechenden Epitope.

5 Diskussion

Gliome sind Tumore des zentralen Nervensystems (ZNS), welche entsprechend den Vorgaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) anhand histopathologischer und molekularbiologischer Eigenschaften in vier Gruppen (WHO[°]I-IV) klassifiziert werden (Louis *et al.*, 2016). Die integrative WHO-Klassifizierung spiegelt hierbei die Malignität und die molekularen Subgruppen der Tumore wider und beeinflusst somit die Auswahl einer entsprechenden Therapie. Die Klasse niedriggradiger Gliome (*Lower Grade Gliomas*, LGGs) beinhaltet WHO[°]II/°III Tumore (Brat *et al.*, 2015) und unterscheidet im Wesentlichen zwischen Astrozytomen (IDH^{mut}, ohne 1p/19q Ko-Deletion), Astrozytomen (IDH^{wt}), Oligodendrogliomen (IDH^{mut}, mit 1p/19q Ko-Deletion) und nicht weiter spezifizierbaren (NOS) niedriggradigen Gliomen (Louis *et al.*, 2016). Mit einem WHO-Grad-abhängigen Überleben von durchschnittlich 8,1 Jahren (WHO[°]II) und 5,6 Jahren (WHO[°]III) bei IDH^{mut} Astrozytomen bzw. 12,2 Jahren (WHO[°]II) und 6,3 Jahren (WHO[°]III) bei IDH^{mut} Oligodendrogliomen weisen LGGs zwar eine deutlich bessere Prognose als Glioblastome (GBMs) (14,6 Monate) auf, bleiben jedoch trotzdem eine tödlich verlaufende Tumorerkrankung (Stupp *et al.*, 2005; Brat *et al.*, 2015).

Während bei GBMs eine standardisierte Behandlung die maximale Resektion (Stummer *et al.*, 2008) und eine kombinierte Radio-/Chemotherapie vorsieht (Stupp *et al.*, 2005), gibt es bei LGGs bislang keinen allgemein akzeptierten Therapiestandard. Eine frühzeitige, maximal mögliche Resektion ist einer Biopsie jedoch aus prognostischer Sicht vorzuziehen (Smith *et al.*, 2008; Ahmadi *et al.*, 2009; Jakola *et al.*, 2012). Ob und in welchem Ausmaß eine Nachbehandlung erfolgt, wird von klinischen und molekularen Prognosefaktoren bestimmt und wird durch das Abwägen von therapeutischen Spätkomplikationen und dem Therapieerfolg teilweise kontrovers diskutiert (van den Bent *et al.*, 2012; Weller *et al.*, 2014).

Durch das wachsende Verständnis über die Tumorbiologie von Gliomen, sowie die Identifizierung neuer molekularer und zellbiologischer Tumorcharakteristika ergeben sich jedoch zunehmend Ansatzpunkte für die Entwicklung spezifischer und personalisierbarer Therapieverfahren (Reardon *et al.*, 2014; Ene und Holland, 2015). Hierbei könnten besonders Immuntherapien durch die Vielfalt an potentiellen Zielstrukturen und Wirkmechanismen ein großes Potenzial besitzen, Hirntumorzellen selektiv zu adressieren (Galluzzi *et al.*, 2014). Das Ziel von Immuntherapien besteht darin, das autologe Immunsystem gegen den Tumor zu sensibilisieren, um dadurch eine spezifische Tumorbekämpfung, insbesondere bei verstreuten Tumorzellen, zu erreichen (Palucka und Coussens, 2016). Hierbei konnten immuntherapeu-

tische Ansätze, wie die Inhibition der sogenannten Immuncheckpoint-Inhibitoren, bereits vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von Melanomen erzielen (Hodi *et al.*, 2010). In Anlehnung an diese Erfolge wird daher auch gegenwärtig die Wirksamkeit bzw. die Unbedenklichkeit der monoklonalen Antikörper Ipilimumab (α -CTLA4-MAb, NCT02017717) und Nivolumab (α -PD1-MAb, NCT02617589) bei der Behandlung von GBM-Patienten in einer Phase-III-Studie untersucht (www.clinicaltrials.gov).

Aktive Immuntherapien, wie beispielsweise der Einsatz von Tumor-spezifischen Vakzinen bei Gliomen, wurden bereits ebenfalls in klinischen Studien untersucht, wobei sich sowohl die Unbedenklichkeit bestätigen ließ (Caruso *et al.*, 2004) als Hinweise auf eine mögliche Effektivität gefunden wurden (Yu *et al.*, 2004; Ardon *et al.*, 2010, 2012). Neben der Verwendung von Tumorlysate-Vakzinen, bei denen autologe dendritische Zellen *in vitro* mit dem Tumorlysate beladen werden, etablierte sich besonders die Verwendung synthetischer Peptide von Tumorantigenen, um eine noch spezifischere T-Zellantwort zu stimulieren (Reardon *et al.*, 2014). Die Eignung solcher Antigene als T-Zell-Zielstrukturen für eine Peptid-Vakzine ist hierbei durch besondere Anforderungen an die Immunogenität, die onkogenen Eigenschaften, als auch die Spezifität definiert (Cheever *et al.*, 2009).

Verschiedene Gruppen widmen sich daher sowohl der Identifizierung von Tumor-spezifischen Antigenen (TSAs) als auch von Tumor-assoziierten Antigenen (TAAs), wobei beide Antigen-Klassen mögliche T-Zell-Zielstrukturen einer Peptid-Vakzine darstellen (Reardon *et al.*, 2014). Die Identifizierung von TSAs erfolgt hauptsächlich durch „indirekte“ Methoden wie beispielsweise der Exom-Sequenzierung und hängt stark von der spezifischen Mutationsrate der jeweiligen Neoplasie ab (Robbins *et al.*, 2013). Es ist daher nicht verwunderlich, dass für die Behandlung von LGGs, welche im Vergleich zum Melanom weitaus weniger somatische Mutationen aufweisen (Lawrence *et al.*, 2013), gegenwärtig nur sehr wenige TSAs, wie beispielsweise IDH1R132H (NCT02454634, Phase I; NCT02193347, Phase I), in klinischen Studien untersucht werden (www.clinicaltrials.gov).

TSAs wie EGFRvIII führen durch ihre Tumor-spezifische Expression, wie beispielsweise von Glioblastomzellen, häufig zu starken T-Zell-vermittelten Immunantworten (Heimberger *et al.*, 2003), wodurch TSA-spezifische Immuntherapien eine hohe Effektivität aufweisen (Sampson *et al.*, 2011). Basierend auf aktuellsten Erkenntnissen scheint eine kurative Behandlung jedoch letztlich an der intratumoralen Heterogenität zu scheitern, da ausschließlich TSA-positive Zellen adressiert werden und es durch die verbleibenden TSA-negativen Tumorzellen zur Rezidivierung kommen kann (<http://www.celldex.com/pipeline/rindopepimut.php>, Stand 30.01.2017).

Im Gegensatz dazu erfolgt die Identifizierung von TAAs sowohl durch „direkte“ (Singh-Jasuja *et al.*, 2004; Dutoit *et al.*, 2012) als auch „indirekte“ Methoden (Liau *et al.*, 2000; Okada *et al.*, 2011), welche allerdings häufig voreingenommene Selektionsschritte voraussetzen und daher keine Aussage über die natürliche Antigenprozessierung, Antigenpräsentation und Antigenerkennung zulassen. TAAs sind Proteine, welche nicht ausschließlich von Tumorzellen exprimiert werden, sondern ebenfalls auch von gesunden Zellen (Reardon *et al.*, 2014). Da sie im Tumor jedoch häufig eine veränderte bzw. deutlich er-

höhte Expression aufweisen, entsprechen auch sie den durch das *National Cancer Institute* priorisierten Eigenschaften möglicher Zielstrukturen für eine Peptid-Vakzine (Cheever *et al.*, 2009).

Während sich die bisherigen Arbeiten zur Identifizierung neuer Tumorantigene in Gliomen nahezu ausschließlich auf GBMs fokussierten (Hatano *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Dutoit *et al.*, 2012), gibt es bis heute nur sehr wenige Arbeiten, die das Proteom bzw. das Immunproteom von LGGs untersuchten (Beckhove *et al.*, 2010; Kalinina *et al.*, 2011; Schumacher *et al.*, 2014).

Die Notwendigkeit einer gesonderten Betrachtung von LGGs wird aber durch das wachsende Verständnis über die Rolle epigenetischer Veränderungen belegt (Guo *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2015; Ceccarelli *et al.*, 2016). Bei Gliomen führen beispielsweise genetische Veränderungen, wie die LGG-spezifischen Punktmutationen im Isocitrat-Dehydrogenase-Gen (IDH^{mut}), zur Synthese des Onko-Metaboliten 2-Hydroxyglutarat (Dang *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2010), welcher sich im Zytoplasma anreichert und sich inhibierend auf die Demethylierung von DNA bzw. Histonen auswirkt (Noushmehr *et al.*, 2010; Yen *et al.*, 2010). Der so entstehende *Glioma CpG Island Methylator Phenotyp* (G-CIMP) ist ein molekularbiologischer Prognosemarker für eine weniger aggressive Tumorbilogie und für einen besseren klinischen Verlauf, wodurch sich IDH^{mut} LGGs deutlich von den IDH^{wt} Gliomen unterscheiden und daher nicht einheitlich betrachtet werden sollten (Noushmehr *et al.*, 2010; Turcan *et al.*, 2012; Brat *et al.*, 2015).

Zu den wenigen Forschungsprojekten, die daher den spezifischen Einsatz von Antigenen in LGGs untersuchten, gehören vorrangig die Arbeiten der Forschungsgruppe um Prof. Dr. Hideho Okada. Antigene, wie beispielsweise IL13R α 2, EphA2, WT1 und Survivin wurden in einer HLA-A*02:01-restringierten Peptid-Vakzine mit einer adjuvanten Polyinosin-Polycytidylsäure-Injektion bei WHO^oII LGGs mit einem hohen Risiko zur Rezidivierung eingesetzt (Okada *et al.*, 2015). Die Antigene EphA2 und IL13R α 2 sowie die Antigene YKL-40 und gp100 konnten des Weiteren in einer dendritischen Zell-Vakzine für die Behandlung von LGG- und GBM-Patienten genutzt werden (Okada *et al.*, 2011). Beide Ansätze belegten die Unbedenklichkeit und führten nachweislich zu erhöhten Antigen-spezifischen T-Zellantworten (Okada *et al.*, 2011, 2015).

Bedingt durch die inter- und intratumorale Heterogenität werden jedoch einzelne TSAs bzw. TAAs nicht von allen Tumorzellen exprimiert (Okada *et al.*, 2008), wodurch der gleichzeitige Einsatz von mehreren T-Zell-Zielstrukturen in einer Multipeptid-Vakzine einen effektiveren Lösungsansatz zur Behandlung der Tumorheterogenität darstellt (Okada *et al.*, 2011, 2015). Daher wird die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit solcher Multipeptid-Vakzinen bereits für die Behandlung von LGGs (NCT02924038 (Pilot)) und GBMs (NCT02149225 (Phase I); NCT02546102 (Phase III)) in den entsprechenden klinischen Studien untersucht (www.clinicaltrials.gov).

Aufgrund des gegenwärtigen Mangels IDH^{mut} LGG-spezifischer Antigene bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit in der Identifizierung und Charakterisierung von neuen und immunogenen Zielstrukturen, welche für die Entwicklung von T-Zell-basierten Immuntherapien eingesetzt werden können. Hier-

für wurde die Methode der zweidimensionalen Proteinfractionierung (PF2D) in Kombination mit dem IFN- γ ELISpot Assay genutzt, um die Komplexität von vier IDH^{mut} LGG-Tumorproteomen zu reduzieren und um systematisch die Immunogenität der fraktionierten Bestandteile, das sogenannte Immunproteom, zu untersuchen und massenspektrometrisch zu analysieren (Beckhove *et al.*, 2010). Mittels *in silico*-Prädiktion wurden synthetische Peptide der potentiellen T-Zell-Zielstrukturen angefertigt, die anschließend im Bezug auf ihre Patienten-spezifische Immunogenität untersucht wurden. Zur Charakterisierung der Zielstrukturen wurde die Expression der erfolgversprechendsten Antigene sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene in IDH^{mut} LGG-Tumoren sowie in normalen Hirngewebe bestimmt. Ergänzend wurde ebenfalls die Expression der Antigene auf nativen IDH^{mut} Stammzell-ähnlichen Gliomzellen (*Glioma Stem-like Cells*) überprüft. Diese Herangehensweise führte schließlich zur Identifizierung von CFL1, CNTN1, CRKII, NME2 und TKT als neue und immunogene T-Zell-Zielstrukturen in IDH^{mut} LGGs, welche basierend auf aktueller Literatur bislang nicht in diesem Zusammenhang beschrieben wurden. Durch elaborative *in silico*-Prädiktionen von reaktiven Epitopen innerhalb der immunogenen Peptidsequenzen konnten des Weiteren HLA-A*02:01-restringierte reaktive Epitope für CRKII, NME2 und TKT ermittelt werden, welche in einem Großteil der IDH^{mut} LGG-Patienten durch bereits existierende Antigen-spezifische T-Zellen erkannt wurden. Die Erkenntnisse dieser Arbeit verdeutlichen zum einen die Effizienz der PF2D-IFN- γ ELISpot-Methode zur Identifizierung neuer immunogener TAAs sowie die Relevanz von CFL1, CNTN1, CRKII, NME2 und TKT als mögliche T-Zell-Zielstrukturen für die Entwicklung einer IDH^{mut} LGG-spezifischen Multipeptid-Vakzine.

5.1 Identifizierung immunogener Antigene im Proteom IDH^{mut}

LGGs mittels PF2D-IFN- γ ELISpot-Methode

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Komplexität von IDH^{mut} LGG-Tumorproteomen durch die PF2D-IFN- γ ELISpot-Methode zu reduzieren, um somit neue und immunogene T-Zell-Zielstrukturen zu identifizieren. Wie bereits durch Beckhove *et al.* beschrieben, handelt es sich bei der PF2D-IFN- γ ELISpot-Methode um ein zweidimensionales Chromatographie-System, welches komplexe Proteingemische zuerst anhand des isoelektrischen Punkts und anschließend anhand der Hydrophobizität der enthaltenen Proteine auftrennt und automatisch fraktioniert (Beckhove *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu anderen proteomischen Analysemethoden, wie beispielsweise der eindimensionalen bzw. zweidimensionalen Gelelektrophorese (2D-PAGE) oder der optimierten zweidimensionalen differentiellen Gelelektrophorese (2D-DIGE) (Iwadata *et al.*, 2004; Fiore *et al.*, 2006; Khalil und James, 2007), befinden sich die Proteine hierbei permanent in einer flüssigen Phase, was die Proteinstruktur konserviert und zudem den direkten Einsatz in immunologischen Assays erlaubt (Beckhove *et al.*, 2010). Zusätzlich unterliegen die Proteine durch eine kurze Analysendauer und stabile PF2D-Prozessparameter wie pH, Druck und Tempera-

tur weitaus weniger proteolytischen und chemischen Veränderungen wie bei vergleichbaren Methoden (McCarthy *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2009). Trypsin-bedingte Modifikationen wie beispielsweise die Desaminierung von Asparagin, aber auch umgebungsabhängige Veränderungen, wie die Zyklisierung von Glutamat am N-Terminus (Ren *et al.*, 2009), verhindern eine natürliche Prozessierung der Proteine, was im Rahmen dieser Arbeit artifizielle bzw. „nicht-native“ Auswirkungen auf die spezifische Erkennung von T-Zell-Antigenen hätte (Kageyama *et al.*, 2001).

5.1.1 Bestimmung potentieller Zielstrukturen durch systematische Reduzierung der Komplexität immunogener Tumorproteomfraktionen

Proteomische Untersuchungsverfahren von Krebszellen oder Tumoren stellen einen relevanten Ansatz zur Identifizierung diagnostischer und prädikativer Biomarker sowie potentieller Zielstrukturen für verschiedene Behandlungsansätze dar (Sallam, 2015). Besonders die Identifizierung von bisher unbekanntem T-Zell-Zielstrukturen stellt hierbei eine der größten Herausforderungen für die Entwicklung von immuntherapeutischen Ansätzen dar (Bot, 2015). Die Nachteile von proteomischen Analysen wie beispielsweise der 2D-PAGE oder der 2D-DIGE liegen in den bereits beschriebenen Proteinmodifikationen sowie einer häufig unzureichenden Sensitivität bzw. einer geringen Reproduzierbarkeit der Analyse (Kondethimmanahalli Chandramouli, 2009). Zudem werden hohe Konzentrationen der Analyten benötigt, wodurch selten vorkommende Proteine, aber auch Proteine mit starken hydrophoben Eigenschaften oftmals nicht nachweisbar sind. Wie durch Beckhove *et al.* bereits gezeigt wurde, ist die hier verwendete PF2D-IFN- γ ELISpot-Methode eben nicht durch solche Nachteile limitiert und verfügt zusätzlich über eine ausreichende Sensitivität, um selbst gering konzentrierte Proteine zu detektieren. Dies führte bereits früher zur Identifizierung von zwei neuen Gliom-assoziierten immunogenen T-Zell-Zielstrukturen (TTR, S100A9), die aus Untersuchungen an einem WHO^oIII Astrozytom resultierten (Beckhove *et al.*, 2010). Darauf aufbauend lag das Ziel dieser Arbeit darin, durch Anwendung der PF2D-IFN- γ ELISpot-Methode, das Wissen um mögliche T-Zell-Zielstrukturen in IDH^{mut} LGGs durch Untersuchung eines größeren Kollektivs zu erweitern und deren Immunogenität, basierend auf spontanen T-Zellantworten, zu bestimmen. Vor Beginn der Analysen wurde zur Qualitätssicherung zuerst der Tumorgehalt der verwendeten Gewebe durch einen erfahrenen Neuropathologen bestimmt, um sicherstellen zu können, dass ausschließlich Tumorgewebe mit einem ausreichend hohen Tumoranteil von > 60 % in die Analysen eingeschlossen werden. Ebenfalls wurde histopathologisch bestätigt, dass alle im Kollektiv enthaltenen astrozytären und oligodendroglialen Tumore über eine IDH-Mutation (*IDH1* und/oder *IDH2*) verfügen.

Anschließend erfolgte die Fraktionierung der Tumorslysate aller vier IDH^{mut} LGG-Gewebe mittels PF2D-Technologie. In der ersten Dimension erfolgte die Fraktionierung des Proteoms, basierend auf dem Prinzip der Chromatofokussierung (CF), durch einen pH-Gradienten der die Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt fokussiert und dadurch auftrennt. Im Gegensatz zur 2D-DIGE bietet die hier verwen-

dete Methode den Vorteil, eine größere Analytenmengen bei gleichzeitig höherer Auflösung aufzutrennen, wodurch auch gering konzentrierte Proteine nachgewiesen werden können (Kondethimmanahalli Chandramouli, 2009).

Dabei zeigten sich in immunologischen Untersuchungen der resultierenden 1D-Fraktionen durch den IFN- γ ELISpot tendenziell mehr autologe T-Zellantworten gegen Fraktionen der Oligodendrogliome (25 von 38) als der Astrozytome (12 von 37). Eine Interpretation dieser Beobachtung ist jedoch bei der geringen Probengröße von jeweils nur zwei Patienten sehr kritisch. Basierend auf genetischen Analysen für IDH^{mut} LGGs scheint jedoch eine erhöhte Immunogenität der Oligodendrogliome durch andere T-Zell-Zielstrukturen wie beispielsweise den TSAs sehr unwahrscheinlich, da beide LGG-Subklassen zwar jeweils über spezifische Mutationen verfügen, sich aber in der totalen Mutationsfrequenz kaum unterscheiden (Brat *et al.*, 2015). Unabhängig von der Häufigkeit immunogener Fraktionen, konnten durch die Ergebnisse des IFN- γ ELISpot Assays jedoch sowohl für Astrozytome als auch für Oligodendrogliome bestätigt werden, dass die in den PF2D-Fraktionen enthaltenen proteomischen Bestandteile der IDH^{mut} LGG-Tumorlysate durch periphere T-Zellen erkannt werden und zu spontanen T-Zellantworten führen.

Immunogene 1D-Fraktionen wurden im Weiteren mittels RP-HPLC in der zweiten Dimension aufgetrennt, wobei erneut spontane T-Zellantworten gegen einige der resultierenden 2D-Fraktionen nachgewiesen werden konnten. Diese Beobachtung war bei allen vier analysierten IDH^{mut} LGG-Tumorgeweben zu erkennen. Der Umfang durchführbarer immunologischer Untersuchungen wurde hierbei jedoch durch die Menge an verfügbaren PBMCs der jeweiligen Patienten limitiert. Da der Patient NCH1150 wiederholt zu Blutspenden zur Verfügung stand, waren ausreichend PBMCs vorhanden, um eine Vielzahl an 2D-Fraktionen (n = 57) im IFN- γ ELISpot untersuchen zu können. Bei anderen Patienten hingegen war die Verfügbarkeit von autologen PBMCs begrenzt, wodurch weniger Fraktionen getestet werden konnten (NCH519a (n = 16), NCH612 (n = 19) oder NCH1390 (n = 19)) und daher einzelne 2D-Fraktionen priorisiert und gepoolt untersucht wurden. Die Entscheidungsgrundlage hierfür lag in der Höhe der entsprechenden Elutions-Peaks, welche ein Maß für die enthaltene Proteinkonzentration waren und statistisch betrachtet, eine Auswirkung auf die Häufigkeit von MHC-präsentierten Peptide haben (Amir *et al.*, 2011).

Durch massenspektrometrische Untersuchungen der immunogenen 2D-Fraktionen aller Patienten konnten insgesamt 3.319 Proteine identifiziert werden. Die Komplexität der Tumorproteome wurde somit auf durchschnittlich 134 Proteine pro immunogene 2D-Fraktion reduziert. Die Patienten-spezifische Betrachtung zeigte, dass die totale Anzahl der identifizierten Proteine pro Patient in Abhängigkeit der untersuchten Fraktionen deutlich variieren kann, weshalb Patient NCH1390 mit 15 untersuchten Fraktionen (n = 1.221 Proteine) etwa doppelt so viele Proteine aufwies wie vergleichsweise Patient NCH612 mit sechs Fraktionen (n = 616 Proteine).

Die proteomischen Bestandteile der immunogenen 2D-Fractionen von beiden Astrozytomen bzw. Oligodendrogliomen wiesen mit 19,7 % bzw. 17,5 % Überlappung eine vergleichbar hohe Ähnlichkeit auf. Im Gegensatz dazu fiel die Schnittmenge zwischen allen vier Patienten mit 73 Proteinen (3,6 %) eher gering aus, was jedoch in Anbetracht der identifizierten Proteine darauf hinweist, dass es sich hierbei hauptsächlich um ubiquitäre Haushaltsproteine handelt. Bei dieser Betrachtung bleibt zu bedenken, dass es sich durch die PF2D-Fraktionierung um eine partielle und rein analytische Darstellung des Immunproteoms handelt. Durch eine relative bzw. quantitative Betrachtung konnte Lin *et al.* beispielsweise sehr wohl eindeutige proteomische Unterschiede zwischen Astrozytomen und Oligodendrogliomen nachweisen, welche auf der differentiellen Biologie im Bezug auf Zellproliferation, Migration, Angiogenese und Malignität beruhen und daher die pathologischen Unterschiede widerspiegeln (Lin *et al.*, 2016).

Zusammengefasst konnte die PF2D-IFN- γ ELISpot-Methode erfolgreich dazu eingesetzt werden, um die Komplexität von IDH^{mut} LGG-Tumorproteomen schrittweise zu reduzieren und die proteomischen Bestandteile immunogener Fraktionen mittels Massenspektroskopie HLA-unabhängig zu identifizieren. Obwohl der Umfang der proteomischen Untersuchungen deutlich durch die Verfügbarkeit autologer PBMCs limitiert war, konnte in Kombination mit einem Literatur- und Datenbank-basierten Filterschritt eine Auswahl von 79 Proteinen identifiziert werden, welche im Bezug auf ihre Eignung als potentielle T-Zell-Zielstrukturen im Weiteren eingehend untersucht wurden.

5.1.2 *In silico*-Vorhersage von synthetischen MHC-I-Peptidsequenzen

Basierend auf der Auswahl an Antigenkandidaten ($n = 79$), welche in immunogenen 2D-Fractionen von IDH^{mut} LGGs identifiziert wurden, erfolgte im Weiteren die Überprüfung und Validierung der Immunogenität dieser potentiellen Zielstrukturen.

Da die experimentelle Epitopkartierung jedoch ein teurer und aufwendiger Prozess ist und durch die limitierte Verfügbarkeit von PBMCs nicht durchführbar war, wurden mittels *in silico*-Vorhersagen Sequenzbereiche mit potentiellen MHC-Klasse-I-Epitopen der Kandidatenantigene bestimmt, welche anschließend als *Synthetic Long Peptides* (SLPs) mit einer Peptidlänge von etwa 50 AS synthetisch hergestellt wurden. Die *in silico*-Vorhersage wurde hierbei auf die fünf am häufigsten vorkommenden HLA-Typen der kaukasischen Bevölkerung restringiert (siehe Tabelle 24) (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2015). Dies ermöglicht es, potentielle Epitope auszuwählen, die unabhängig von einzelnen HLA-Typen durch dendritische Zellen prozessiert bzw. anschließend durch das natürliche Repertoire an MHC-Klasse-I-Molekülen der jeweiligen Ursprungspatienten präsentiert werden. Dieser Ansatz stellt einen großen Vorteil gegenüber den meisten Studien dar, welche sich hauptsächlich auf die Untersuchung von HLA-A*02-restringierten Epitopen beschränken und dadurch in ihrer Anwendbarkeit auf die nur etwa 50 % der kaukasischen Bevölkerung ausmachenden HLA-A*02-positiven Patienten beschränkt sind (Okano

et al., 2002; Okada *et al.*, 2011, 2015; Gonzalez-Galarza *et al.*, 2015; Dutoit *et al.*, 2012).

Die *in silico*-Vorhersage von B- oder T-Zell-Epitopen ist mittlerweile eine gängige Methode, welche auf einer wachsenden Anzahl bioinformatischer Algorithmen und umfangreichen Datenbanken beruht (Charoentong *et al.*, 2012). Zu den aktuell meist zitierten Vorhersage-Programmen gehören unter anderem die IEDB (Vita *et al.*, 2009), MHCBN (Lata *et al.*, 2009) sowie SYFPEITHI (Rammensee *et al.*, 1999), welche zugleich auch zu den größten Datenbanken gehören, sich aber in den Prädiktionsparametern und den zugrundeliegenden Daten unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Vorhersage der potentiell immunogenen Epitope der NetMHCpan-Vorhersagealgorithmus in Kombination mit der IEDB-Datenbank verwendet (Hoof *et al.*, 2009; Vita *et al.*, 2009). Durch den Algorithmus wird sowohl die Wahrscheinlichkeit, dass ein Epitop durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) prozessiert wird, als auch die Bindeaffinität, mit der es auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert wird, in die Berechnung miteinbezogen. Wie bereits auch durch Peters *et al.* beschrieben, stellt besonders die kombinierte Betrachtung der TAP-Prozessierung sowie der MHC-Klasse-I-Bindeaffinität ein effektives Auswahlkriterium für die Selektion möglicher Epitope dar (Peters *et al.*, 2003). Obwohl sich die Vorhersage-Programme in den letzten Jahren durch umfangreichere Algorithmen stetig verbessert haben, berichtet Sait *et al.* immer noch über deutliche Unterschiede bei der Suche nach überlappenden TSAs zwischen verschiedenen Datenbanken (Sait *et al.*, 2016). Eine umfangreiche experimentelle Validierung der *in silico*-vorhergesagten Peptide im Bezug auf ihre Immunogenität ist daher unumgänglich.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte experimentelle Validierung mittels IFN- γ ELISpot-Assay, konnte daher die Immunogenität für 26 von 79 der prädiktierten SLPs in den jeweiligen Ursprungspatienten bestätigen. Interessanterweise gehört auch das durch Beckhove *et al.* als „immunogen“ beschriebene LGG-Tumorantigen S100A9 zu den potentiellen T-Zell-Zielstrukturen der 79 ausgewählten Antigenkandidaten (Beckhove *et al.*, 2010). Die Immunogenität dieses SLPs im Ursprungspatienten NCH612 konnte jedoch nicht bestätigt werden, obwohl für die Untersuchungen ein zwar verkürztes jedoch Sequenz-identisches Polypeptid verwendet wurde, welches im Besonderen das immunogene Epitop S100A9_{9/1} (NIETIINTFHQYSVKLGHPD) beinhaltet. Da die Immunogenität im Ursprungspatienten eine Voraussetzung für weitere Untersuchungen darstellte, verdeutlicht diese Beobachtung, dass es sich auch bei den ausgeschlossenen Antigenkandidaten um immunogene T-Zell-Zielstrukturen handeln kann, die jedoch im Zuge dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden konnten. Die 26 im Ursprungspatienten immunogenen SLPs wurden dagegen eingehend charakterisiert und für die Verwendung als potentielle T-Zell-Zielstrukturen weiter untersucht.

Zusammengefasst belegen diese Ergebnisse zum einen die Effektivität bioinformatischer Vorhersagealgorithmen zur Prädiktion immunogener Antigene und verdeutlichen zugleich die Notwendigkeit einer experimentellen Validierung. Zum anderen verdeutlichen diese Ergebnisse aber auch die Effizienz der PF2D-IFN- γ ELISpot-Methode. Durch die systematische Fraktionierung, welche auf unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften der Proteine beruhte, war es möglich, die Komplexität der IDH^{mut} LGG-

Tumorlysate sukzessiv zu reduzieren, um dadurch potentielle T-Zell-Zielstrukturen des Immunproteoms zu identifizieren.

5.2 Eignungsbestimmung potentieller Zielstrukturen für die Verwendung in einer LGG-spezifischen Peptid-Vakzine

Um zu bestimmen, inwiefern sich die 26 immunogenen SLPs beispielsweise für die Verwendung als mögliche T-Zell-Zielstrukturen einer LGG-spezifischen Peptid-Vakzine eignen würden, bezogen sich die weiteren Schritte zur Charakterisierung der Proteine auf denen durch das *National Cancer Institute* priorisierten Eigenschaften „idealer“ Zielstrukturen für Tumor-spezifische Impfstoffe (Cheever *et al.*, 2009). Hierbei handelt es sich um definierte Kriterien mit entsprechender Definition und Gewichtung, welche bei der Auswahl potentieller Antigene deren Relevanz festlegen. Mittels Rangordnung wurde hierbei die Immunogenität eines Antigens, definiert als die Fähigkeit spontane T-Zell-vermittelte IFN- γ Immunantworten hervorzurufen, als eine der wichtigsten Eigenschaften ermittelt. Weitere entscheidungsrelevante Kriterien sind in absteigender Reihenfolge die onkogenen Eigenschaften, die Spezifität, die Expressionsstärke sowie die Anzahl Antigen-positiver Tumorzellen, die Expression auf Tumorstammzellen und letztlich die zelluläre Lokalisation. Die aufgeführten Eigenschaften werden im Weiteren für jedes Antigen im Einzelnen beschrieben und führten schließlich zur Bestätigung bzw. dem Ausschluss geeigneter T-Zell-Zielstrukturen.

5.2.1 Bestimmung der Immunogenität potentieller T-Zell-Zielstrukturen

Die Immunogenität von Epitopen stellt basierend auf den eben beschriebenen Kriterien eine der grundlegendsten Eigenschaften für Antigene in einer Peptid-Vakzine dar (Cheever *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob und in welchem Maß die im Ursprungspatienten immunogenen SLPs auch zu spontanen T-Zellantworten in einem größeren Kollektiv von IDH^{mut} LGG-Patienten führen.

Um einen Einfluss der Immunseneszenz (Wagner, 2011; Zhou, 2013), d.h. altersabhängige Veränderungen bzw. eine reduzierte Leistungsfähigkeit des Immunsystems mit zunehmendem Alter ausschließen zu können, wurde das Patientenkollektiv (Median: 41 Jahre) spezifischen dem kulminierenden Diagnosealter von IDH^{mut} LGG-Patienten (35-44 Jahre) angepasst (Ostrom *et al.*, 2015). Des Weiteren wurde auch auf eine relative Gleichverteilung von Astrozytomen ($n = 9$) und Oligodendrogliomen ($n = 7$) geachtet, um eine Einseitigkeit durch eine der beiden LGG-Subentitäten zu verhindern. Unter Verwendung dieses IDH^{mut} LGG-Patientenkollektivs konnte daher die Immunogenität der im Ursprungspatienten immunogenen SLPs ($n = 26$) mittels Validierungs-ELISpots weiter untersucht werden.

Insgesamt konnten für 23 der 26 SLPs signifikante T-Zellantworten in mindestens einem IDH^{mut} LGG-Patienten nachgewiesen werden. Hierbei zeigte besonders CRKII eine äußerst hohe Immunogenität,

da es in mehr als 50 % der Patienten zu spontanen T-Zellantworten führte. Auch die Kandidatenantigene CFL1, CNTN1 und NME2 (alle 43,8 %) und TKT (25,0 %) führten in den untersuchten IDH^{mut} LGG-Patienten zu einer signifikant erhöhten IFN- γ -Sekretion durch T-Zellen. Hierbei zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Astrozytom- und Oligodendrogliom-Patienten, was darauf schließen lässt, dass die Antigene in beiden LGG-Subentitäten exprimiert und auch von T-Zellen erkannt werden.

Antigene wie beispielsweise PKM2, PCNP, FSCN1, FH, HSPA4 oder SNRNP70 (18,8 %) verfehlten jedoch den von uns gesetzten Cut-Off einer hohen Immunogenität in mindestens 25 % der IDH^{mut} LGG-Patienten, weshalb sie von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden. Obwohl diese Antigene ebenfalls immunogene T-Zell-Zielstrukturen darstellen, konnten sie durch die limitierte Verfügbarkeit von PBMCs und der daraus resultierenden Priorisierung nach Relevanz nicht weiter untersucht werden.

Um ergänzend sicherstellen zu können, dass es sich bei den nachgewiesenen T-Zellantworten um Patienten-spezifische und gegen den Tumor-gerichtete T-Zellantworten handelt, wurden die SLPs auch in einem Kollektiv gesunder Individuen ($n = 13$) getestet. Hierbei konnte gezeigt werden, dass keiner der gesunden Individuen spontane T-Zellantworten gegen CKRII, CFL1 und CNTN1 aufwies. Da auch NME2 und TKT in weniger als 10 % der gesunden Probanden zu einer IFN- γ T-Zellantwort führten, konnten unspezifische T-Zellantworten gegen diese fünf Antigenkandidaten weitestgehend ausgeschlossen werden. Im direkten Vergleich der IFN- γ -Spotzahlen in gesunden Probanden wiesen die IDH^{mut} LGG-Patienten signifikant höhere T-Zellantworten gegen die genannten Antigene auf, was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei vermutlich um Tumor-spezifische T-Zellantworten handeln muss.

Bei detaillierter Betrachtung der Ergebnisse dieser Analyse fiel besonders der gesunde Proband GP2 auf, welcher gegen 8/26 Antigene (30,8 %) eine signifikante IFN- γ Sekretion durch T-Zellen aufwies. Ursachen hierfür sind möglicherweise der gesundheitliche Zustand des Probanden zum Zeitpunkt der Blutentnahme oder die Funktionalität der eingesetzten PBMCs, welche theoretisch durch Temperaturfluktuationen während der Lagerung oder einem zu langsamen Auftauprozess negativ beeinflusst wurden (Germann *et al.*, 2013).

Zusammengefasst konnte durch die experimentelle Validierung in einem umfangreichen IDH^{mut} LGG-Patientenkollektiv für 5 der 26 getesteten Antigene frequente IFN- γ T-Zellantworten nachgewiesen werden. Hierbei zeigten sich die Antigene CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT als robuste T-Zell-Zielstrukturen, die, unabhängig der LGG-Subentität, in bis zu 50 % der Patienten und gleichzeitig in weniger als 10 % der gesunden Individuen zu spontanen IFN- γ Immunantworten führten.

5.2.2 Bestimmung der onkogenen Eigenschaften und Spezifität potentieller T-Zell-Zielstrukturen

Auf der Grundlage einer Tumor-spezifischen Immunogenität in IDH^{mut} LGG-Patienten wurden CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT als potentielle TAA-Kandidaten ausgewählt und in Anlehnung an die von Cheever *et al.* definierten Kriterien für Tumorantigene weiter charakterisiert (Cheever *et al.*, 2009).

Hierfür wurde zuerst versucht, die onkogenen Eigenschaften der Antigene durch umfangreiche Literaturrecherche im Bezug auf Gliome sowie andere Neoplasien zu erörtern. Ein besonderer Fokus lag hierbei auf Überlebensassoziationen oder dem Zusammenhang mit einem aggressiveren Verlauf der Tumorerkrankung. Anschließend erfolgten mRNA-Genexpressionsanalysen unter Berücksichtigung der molekularbiologisch definierten LGG-Subtypen in dem umfangreichen IDH^{mut} LGG-Datensatz des TCGA-Konsortiums (Brat *et al.*, 2015). Dieser genomische Datensatz ermöglichte eine differenzierte Betrachtung der Genexpression in Astrozytomen und Oligodendrogliomen und erlaubte zusätzlich den Vergleich zu normalen (nicht-malignen) Hirngewebebeobachtungen (Brennan *et al.*, 2013).

Im weiteren Verlauf wurde die Spezifität sowie die Expressionsstärke, die Häufigkeit Antigen-positiver Tumorzellen, aber auch die subzelluläre Lokalisation der Antigene in IDH^{mut} LGG-Tumorzellen untersucht. Hierfür wurden in einem umfangreichen Kollektiv, bestehend aus jeweils zehn WHO[°]II bzw. WHO[°]III Astrozytomen und jeweils zehn WHO[°]II bzw. WHO[°]III Oligodendrogliomen ($n_{\text{total}} = 40$) die Antigenexpression mittels immunhistochemischer Färbungen evaluiert.

Zusätzlich erfolgte eine Überprüfung der Antigenexpression auf IDH^{mut} GSC-Zelllinien. Basierend auf dem Gliom-Stammzellkonzept (Nguyen *et al.*, 2012; Beck und Blanpain, 2013; Meacham und Morrison, 2013) stellen die verhältnismäßig gering vorkommenden GSCs eine sehr wichtige Zellpopulation dar, die in der Lage ist das Tumorstadium aufrecht zu erhalten und zu schnell proliferierenden Tumorzellen zu differenzieren, welche dann den Großteil der Tumormasse bilden (Galli *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004). Besonders im Hinblick auf den klinischen Krankheitsverlauf sind GSCs aufgrund der Therapieresistenz eine mögliche Ursache für das schlechte Gesamtüberleben der Patienten (Campos *et al.*, 2010; Bourkoula *et al.*, 2014). Daher stellt die Verwendung der in der Arbeitsgruppe etablierten IDH^{mut} GSC-Zelllinien eine einmalige Möglichkeit dar, die Tumor-spezifische Expression von CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT an gut charakterisierten GSCs zu überprüfen bzw. zu quantifizieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Literaturrecherche und der Antigen-spezifischen experimentellen Charakterisierung der T-Zell-Zielstrukturen, in absteigender Reihenfolge ihrer Immunogenität, ausführlich beschrieben und zusammengefasst.

5.2.2.1 Charakterisierung von CRKII

CRKII ist Teil einer Familie von CRK-Adaptorproteinen (*V-Crk Avian Sarcoma Virus CT10 Oncogene Homolog*), welche bereits 1988 von Mayer *et al.* identifiziert und als Protoonkogen (v-CRK oder Gag-CRK) beschrieben wurden (Mayer *et al.*, 1988). Das Gen, welches zuerst im Genom des fehlerhaften *Avian Sarcoma Retrovirus Chicken-Tumor Virus-10* (CT-10) identifiziert wurde, codiert für ein Protein, welches strukturelle Ähnlichkeit zu Signalproteinen wie beispielsweise der *Non-Receptor Tyrosine Kinase / Phospholipase C- γ* aufweist. Trotz fehlender katalytischer Domäne und damit ohne katalytische Aktivität ist CRK in der Lage, die Tyrosin-Phosphorylierung zu verstärken, weshalb es als *CT10 Regulator of Kinase* (CRK) benannt wurde. Bei den CRK-Adaptorproteinen handelt es sich um regulierende Untereinheiten, die an der Plasmamembran exprimiert werden und dort die Aktivierung von Enzymen wie beispielsweise EGFR sowie HER-2,-3 oder -4 durch die Rekrutierung weiterer Proteine bei der Signaltransduktion unterstützen (Prenzel *et al.*, 2001). Dadurch spielen sie eine wichtige Rolle für das Zellwachstum bzw. die Reorganisation des Zytoskeletts bei Adhäsion, Migration und Phagozytose (Feller, 2001). In Abhängigkeit von Rho- und Rac-GTPasen regulieren sie besonders in Neoplasien die Zellmobilität und beeinflussen darüber unter anderem das Tumorstadium (Wang *et al.*, 2007).

Der interagierende Komplex aus Adaptorproteinen der CRK-Familie (P46108) besteht aus den drei funktionell unterschiedlichen Isoformen CRKI (204 AS, P46108-2), CRKII (304 AS, P46108-1) und CRKIII (283 AS) (Matsuda *et al.*, 1992; Reichman *et al.*, 1992; Prosser *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2003) sowie dem dazugehörigen CRK-like (CRKL, 303 AS, P46109) Protein (ten Hoeve *et al.*, 1993; Feller, 2001). Die bekannten Splice-Varianten von *CRK* weisen einen identischen modularen Aufbau aus den

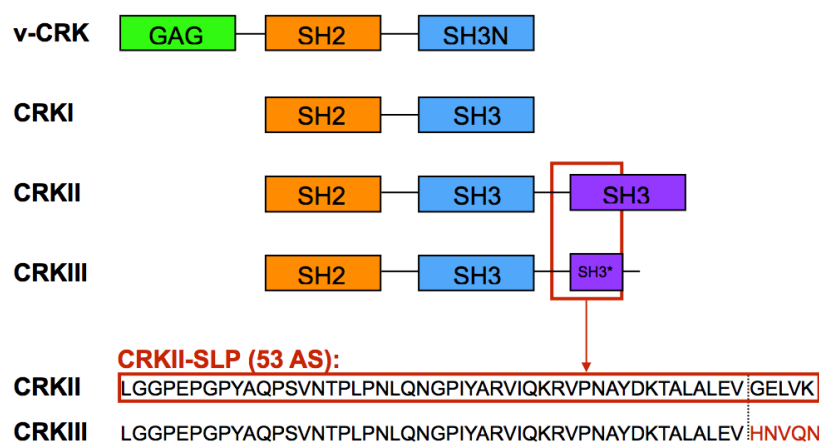


Abbildung 32: Modularer Aufbau der funktionell unterschiedlichen CRK-Adaptorproteine. Die farbigen Boxen repräsentieren die Module *Viral Group specific Antigen* (GAG), *Src-homology 2* (SH2) und *Src-homology 3* (SH3). Die beiden Adaptorproteine CRKII und CRKIII enthalten zusätzlich eine zweite SH3-Domäne, welche bei CRKIII allerdings verkürzt ist, jedoch ebenfalls 92,5 % Peptidsequenz des immunogenen CRKII-SLP (53 AS) beinhaltet (Prosser *et al.*, 2003).

beiden Domänen *Src-homology 2* (SH2) und *Src-homology 3* (SH3) auf (Prosser *et al.*, 2003) (Abbildung 32). Basierend auf dem Wissen über die Relevanz der SH-Domänen konnte gezeigt werden, dass auch die CRK-Proteine zur onkogenen Zelltransformation beitragen (Iwahara *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2009). Tierversuche bei nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom zeigten, dass eben diese Transformationen, welche unter anderem durch die mutierte Version von *EGFR* verursacht werden, durch eine Inhibition des Onkoproteins Src (SH2/SH3) verhindert werden kann (Chung *et al.*, 2009)

In einer Vielzahl von invasiven Tumoren, wie beispielsweise dem Adenokarzinom (Miller *et al.*, 2003), konnte eine CRKII-Überexpression gezeigt werden (Nishihara *et al.*, 2002). Darüber hinaus ist auch eine malignitätsabhängige Überexpression von CKRI und CRKII bei WHO[°] III-IV Gliomzellen beschrieben (Rodrigues *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007). Diese Beobachtungen decken sich mit Erkenntnissen unserer Untersuchung, bei der sowohl eine WHO-Grad-abhängige Zunahme der mRNA- als auch der Protein-Expression gezeigt werden konnte. Die immunhistochemischen Untersuchungen von WHO[°] II und [°] III Astrozytomen bzw. Oligodendrogliomen zeigte dabei eine gleichermaßen schwache Proteinfärbung, wobei die Häufigkeit CRKII-positiver Zellen zumindest in Oligodendrogliomen mit dem WHO-Grad anstieg. Trotzdem konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene eine differenzielle Expression des Antigens in den Tumorgeweben im Vergleich zu normalen Hirngeweben nachgewiesen werden.

Hinweise auf einen durch Nishihara *et al.* beschriebenen Zusammenhang zwischen der CRKII-Expression und der Proliferationsgeschwindigkeit von Tumorzellen (Nishihara *et al.*, 2002) ließen sich ebenfalls in dieser Arbeit durch Untersuchungen an IDH^{mut} GSCs indirekt bestätigen. Die aggressiveren und schneller wachsenden WHO[°] IV IDH^{mut} GSCs wiesen mit durchschnittlich 69,1 % deutlich mehr CRKII-positive Zellen auf als WHO[°] III IDH^{mut} GSCs (durchschnittlich: 7,75 %).

Im Bezug auf die Immunogenität der mittels PF2D und IFN- γ ELISpot Assay identifizierten Antigenkandidaten ist CRKII das wohl herausragendste Antigen. Das getestete Peptid führte in mehr als 50 % aller IDH^{mut} LGG-Patienten zu einer T-Zellantwort, welche in gesunden Probanden vollständig ausblieb. Dadurch erfüllt CRKII die durch das *National Cancer Institute* priorisierte Eigenschaft einer selektiven Immunogenität in Patienten (Cheever *et al.*, 2009). Da das in dieser Arbeit verwendete CRKII-SLP im Sequenzbereich des zweiten SH3-Moduls lokalisiert ist (siehe Abbildung 32), findet sich die Peptidsequenz der immunogenen T-Zell-Zielstruktur CRKII zu 92,5 % ebenfalls in der onkogenen Splicevariante CRKIII. Dies erweitert das therapeutische Potential des Peptids, da zusätzlich ein weiteres Protein der CRK-Familie erkannt und adressiert werden kann (Prosser *et al.*, 2003).

Zusammengefasst erfüllt CRKII alle Anforderungen eines immunogenen und spezifischen TAAs, weshalb der Einsatz des Peptids als mögliche T-Zell-Zielstruktur im Rahmen einer IDH^{mut} Immuntherapie denkbar wäre. Weiterführend sollte daher besonders die direkten Korrelation der CRKII-Expression in Abhängigkeit der Proliferationsgeschwindigkeit von IDH^{mut} GSCs untersucht werden, wodurch sich CRKII möglicherweise für die Behandlung von aggressiven Gliomen eignen würde.

5.2.2.2 Charakterisierung von CFL1

Das Aktin-bindende Protein Cofilin 1 (CFL1) sowie dessen muskuläre Isoform CFL2 gehören zur Klasse der *Actin Depolymerizing Factors* (ADF) (Dominguez und Holmes, 2011). Ihre Funktion besteht grundsätzlich in der Depolarisierung von Aktinfilamenten (filamentöses (F)-Aktin zu globulärem (G)-Aktin), was eine dynamische Regulierung der Aktin-Moleküle ermöglicht und deshalb eine essentielle Rolle für verschiedenste zelluläre Prozesse wie die Zellmorphologie oder Organisation des Zytoskeletts darstellt. Des Weiteren unterstützt CFL1 aber auch die Ausbildung von Netzwerken zwischen Aktin-Filamenten und Lamellipodien bzw. Filopodien (Bernstein und Bamburg, 2010). Dadurch steht die CFL1-Expression auch in einem direkten Zusammenhang mit der Zelladhäsion bzw. -motilität (Hotulainen und Hoogenraad, 2010), der Invasion von Tumorzellen (Yamaguchi *et al.*, 2005) sowie der Angiogenese (Keezer *et al.*, 2003).

Es existiert zwar bisher keine Literatur, welche die differentielle Expression von *CFL1* in LGGs beschreibt, jedoch konnte bereits eine signifikante *CFL1*-Überexpression in GBMs im Vergleich zu gesunden Hirngeweben nachgewiesen werden (Park *et al.*, 2014). Basierend auf unseren TCGA mRNA-Genexpressionsanalysen konnten wir eine signifikante Überexpression von *CFL1* in WHO[°]II und WHO[°]III Astrozytomen nachweisen, welche jedoch nicht in Oligodendrogliomen (WHO[°]II oder [°]III) erkennbar war. Unsere Erkenntnisse aus Analysen an IDH^{mut} LGGs ergänzen daher das bisherige Wissen über die *CFL1*-Expression in Gliomen.

Obwohl CFL1 ein ubiquitär vorkommendes Protein ist, konnte bereits in verschiedenen Neoplasien, wie beispielsweise dem Mammakarzinom (Shaheed *et al.*, 2013) oder dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, eine Überexpression von CFL1 nachgewiesen werden, weswegen sich CFL1 bereits als geeigneter prognostischer Marker zeigte (Castro *et al.*, 2010). Bei proteomischen Analysen (2D-Gelelektrophorese) an oralen Plattenepithelkarzinomen konnte CFL1 zudem durch seine differenzielle Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe als neues TAA identifiziert werden (Turhani *et al.*, 2006), jedoch ohne im Weiteren einen Bezug zur Immunogenität des Antigens herzustellen.

Auch in unseren Untersuchungen durch immunhistochemische Färbungen an IDH^{mut} LGG-Tumorgeweben konnte eine differenzielle Proteinexpression im Vergleich zu normalen Hirngeweben festgestellt werden. Dies bestätigt bereits publizierte Ergebnisse, bei denen Nagai *et al.* durch immunhistochemische Färbung an einem umfangreichen Tissue-Microarray astrozytärer Tumore (n = 55, WHO[°]I-IV) zeigen konnte, dass die CFL1-Expression mit ansteigendem WHO-Grad signifikant zunimmt (Nagai *et al.*, 2012). Neben der WHO-Grad-abhängigen Expression von CFL1 in Gliomen konnte zudem auch ein direkter Zusammenhang zwischen der CFL1-Phosphorylierung bzw. der Aktivierung des CFL1-Signalweges und der Invasivität der GBM-Zelllinie U251 *in vivo* festgestellt werden. Durch Inhibierung der beiden CFL1-phosphorylierenden LIM Domain Kinasen 1 und 2 (LIM1/2) mittels der niedermolekulare Verbindungen BMS-5 und Cucurbitacin I, konnte zudem die Aktivierung des CFL1-Signalweges

unterdrückt werden, was wiederum zu einer reduzierten Migration bzw. Invasivität der GBM-Zellen führte (Park *et al.*, 2014).

Diese Erkenntnisse lassen sich auch auf unsere Untersuchungen an IDH^{mut} GSCs übertragen, welche ebenfalls einen positiven Zusammenhang zwischen der CFL1-Expression und dem WHO-Grad zeigten. Zur weiteren Bestätigung, müssten auch die in dieser Arbeit verwendeten GSCs *in vitro* durch CFL1-Knockdown-Versuche und anschließende *in vivo*-Implantation genauer untersucht werden.

Untersuchungen von CFL1 in verschiedenen Gliom-Zelllinien deuten im Weiteren darauf hin, dass eine reduzierte *CFL1*-Genexpression eine mögliche Ursache für die Ausbildung eines radiosensitiven Phänotyps darstellt (Du *et al.*, 2015). Unabhängig davon berichtete auch Zhou *et al.* erst kürzlich über den Rac1WAVE2Arp2/3-Signalweg, welcher die Expression von CFL1 reguliert und dadurch indirekt zur Ausbildung dieses radiosensitiven Phänotyps beiträgt (Zhou *et al.*, 2016).

Die Tatsache, dass CFL1 bereits zuvor als TAA in oralen Plattenepithelkarzinomen sowie als Stadienspezifischer Marker für das Mammakarzinom identifiziert wurde, unterstützt unsere Ergebnisse mittels PF2D-IFN- γ ELISpot-Analyse. Die zusätzlichen Erkenntnisse über die Immunogenität sowie die differentielle Expression in IDH^{mut} LGGs als auch die Expression auf IDH^{mut} GSCs verdeutlicht die Relevanz des Antigens und die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen.

5.2.2.3 Charakterisierung von CNTN1

Contactin-1 (CNTN1) ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein mit einem Glykosylphosphatidylinositol-Anker, welches zur Familie der *Immunoglobulin Type Cell Adhesion Molecules* (IgCAMs) gehört (Falk *et al.*, 2002). Neben einer Vielzahl verschiedener Zelladhäsionsmoleküle, wie beispielsweise dem *Neural Cell Adhesion Molecule* (NCAM) oder dem *Myelin-Associated Glycoprotein* (MAG) ermöglicht CNTN1 durch Interaktion mit dem Notch-Rezeptor die spezifische Verbindung zwischen Axonen und den Gliazellen im ZNS, wodurch die Myelinisierung und die Differenzierung von Oligodendrozyten reguliert wird (Bartsch, 2003; Popko, 2003). Das Zelladhäsionsmolekül CNTN1 wird daher hauptsächlich von Neuronen und Oligodendrozyten exprimiert, was besonders während der Entwicklungsphase des Gehirns zu vorübergehend hohen Expressionsniveaus führen kann (Virgintino *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2000). Obwohl die Funktion von CNTN1 noch nicht vollständig aufgeklärt ist, scheint das Antigen besonders durch die Aktivierung des Notch-Signalweges (Guruharsha *et al.*, 2012) eine wichtige Rolle für die Regulierung des aggressiven Wachstumsverhaltens von Gliomen zu spielen (Stockhausen *et al.*, 2010; Giachino *et al.*, 2015). Hierbei ist der inaktivierte Notch-Signalweg (Tumorsuppressor) eine charakteristische Eigenschaft von LGGs und sGBMs, während pGBMs einen abnormal aktivierten Notch-Signalweg aufweisen (Stockhausen *et al.*, 2010). Daher scheint es nicht verwunderlich, dass *CNTN1* im Rahmen molekularbiologischer Analysen an GBMs bereits als neues Onkogen identifiziert wurde (Nord *et al.*, 2009). Das entsprechende Gen *CNTN1* ist in der chromosomalen Region 12q11-q12 lokalisiert, wel-

ches in Abhängigkeit des WHO-Grades bei Gliomen ein häufig mutiertes Chromosom darstellt (Reifenberger *et al.*, 1995; Eckerich *et al.*, 2006). Interessanterweise zeigten die von uns durchgeführten mRNA-Analysen jedoch keinerlei Expressionsunterschiede innerhalb der LGG-Subgruppen sowie im Vergleich zu normalen Hirngeweben, was im Bezug auf den Aktivierungsstatus des Notch-Signalwegs zu den beschriebenen Eigenschaften von LGGs passen würde (Stockhausen *et al.*, 2010). Des Weiteren wird dazu von Lu *et al.* beschrieben, dass die LGG-spezifischen epigenetischen Veränderungen durch die IDH^{mut}-bedingte Ausbildung des CpG-Phänotyps (DNA-Hypermethylierung) zur Stilllegung der Transkription der beiden Zelladhäsionsmoleküle *CNTN1* und *ITGA9* führt (Lu *et al.*, 2013).

Eine äußerst umfangreiche Arbeit zur Beschreibung der biologischen Rolle von CNTN1 in Gliomen wurde durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Katrin Lamszus durchgeführt, die wie auch andere eine *in vitro*-Überexpression von CNTN1 auf GFAP-positiven GBM-Zellen nachweisen konnte (Eckerich *et al.*, 2006; Rome *et al.*, 2006). Zusätzlich wurde gezeigt, dass CNTN1, welches wie bereits beschrieben in gesunden Astrozyten aber auch in astrozytären Zelllinien nicht exprimiert wird (Koch *et al.*, 1997), in astrozytären Tumoren jedoch eine in Abhängigkeit des WHO-Grades zunehmende Expression aufweist (Eckerich *et al.*, 2006).

Die Eigenschaft einer nicht-adhärenz-fördernden bzw. sogar „abstoßenden“ Wirkung auf andere ZNS-Zellen (Pesheva *et al.*, 1993) wird als mögliche Erklärung für die mit dem WHO-Grad ansteigende charakteristische diffuse Infiltration von Gliomzellen postuliert (Eckerich *et al.*, 2006).

CNTN1 wird auch als natürlicher Ligand von Tenascinen (Zisch *et al.*, 1992; Czopka *et al.*, 2010) und unter anderem auch von Tenascin-C beschrieben (Falk *et al.*, 2002), welches selbst einen prognostischen Marker für ein verkürztes progressionsfreies Überleben in LGGs darstellt (Herold-Mende *et al.*, 2002).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse auf mRNA- und Proteinebene decken sich mit bestehenden Veröffentlichungen und ergänzen das Wissen um das bisher unbeschriebene immunologische Potential des Antigens. Auch wir konnten eine differenzielle CNTN1-Proteinexpression in allen IDH^{mut} LGG-Geweben im Vergleich zu normalen Hirngeweben sowie einen WHO-Grad-abhängigen Zusammenhang der Expressionsstärke für Astrozytome nachweisen. Die Quantifizierung von CNTN1-exprimierenden IDH^{mut} GSCs zeigte zusätzlich deutliche Unterschiede zwischen WHO[°]III (20,2 % positive Zellen) und WHO[°]IV GSCs (80,5 % positive Zellen), die auch auf eine Malignitätsabhängigkeit bei GSCs hinweisen. CNTN1 erfüllt somit alle durch Cheever *et al.* priorisierten Kriterien für die Verwendung als T-Zell-Zielstruktur in einer Peptid-Vakzine und sollte daher zukünftig weiter charakterisiert werden (Cheever *et al.*, 2009). Hierbei könnte der Vergleich zwischen IDH^{mut} und IDH^{wt} Gliomen dabei helfen, den Einfluss von IDH^{mut}-bedingten epigenetischen Veränderungen auf die Expression von CNTN1 zu verstehen und gegebenenfalls CNTN1 auch als potentielles TAA in IDH^{wt} Gliomen zu identifizieren.

5.2.2.4 Charakterisierung von NME2

Die *Nucleoside Diphosphate Kinase 2* (NME2, Alias: NME/NM23) ist ein multifunktionales Protein, welches hauptsächlich für die Synthese von Nucleosidtriphosphaten (Nucleotide) verantwortlich ist (Martin *et al.*, 1998). Die Funktionen von NME2 korrelieren eng mit der Differenzierung, der Proliferation sowie der Apoptose von Zellen (Amendola *et al.*, 1997; Lombardi *et al.*, 2000).

Im Kontext von Krebserkrankungen wird NME2 bzw. NM23 häufig als Metastasierungssuppressor beschrieben (Fournier *et al.*, 2003). Die supprimierende Wirkung der beiden Isoformen NM23-H1 und NM23-H2 konnte sowohl in Tumoren wie dem Melanom (Rusciano, 2000) oder Mammakarzinom (Hartsough und Steeg, 2000) aber auch in Melanom-, Mammakarzinom- oder Leberzellkarzinom-Zelllinien belegt werden (Baba *et al.*, 1995; Kantor *et al.*, 1993). Als einer der wichtigsten Transkriptionsaktivatoren des *Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (c-MYC)* Gens (Postel *et al.*, 1993; Berberich und Postel, 1995), scheint die Expression von NME2 (*in vitro*) invers mit dem migratorischen und invasiven Verhalten von Gliomzellen zu korrelieren (Jung *et al.*, 2006). Unsere Daten konnten diese Beobachtung nicht bestätigen. Es zeigte sich im Gegensatz, dass die mRNA-Expression von *NME2* in den aggressiveren WHO[°]III LGGs tendenziell höher ist als in WHO[°]II LGGs. Zusätzlich zeigte sich durch Überlebensanalysen am IDH^{mut} LGG-TCGA-Kollektiv, dass sowohl Patienten mit WHO[°]II Oligodendrogliomen als auch WHO[°]II und [°]III Oligodendrogliomen ein signifikant längeres Überleben bei einer geringeren *NME2*-Expression aufweisen.

Basierend auf diesem Wissen ist es daher nicht verwunderlich, dass auch bei quantitativen Untersuchungen nur 2/3 der WHO[°]IV GSC-Zelllinien (NCH551b, NCH645) geringfügig mehr NME2-positive Zellen aufwiesen als die weniger aggressiven WHO[°]III GSC-Zelllinien und sich damit auch bei den GSC-Zelllinien keine Korrelation mit dem WHO-Grad zeigte. Um jedoch eine Aussage über die Assoziation mit dem migratorischen und invasiven Verhalten von Gliomzellen treffen zu können, wären weiterführende Experimente empfehlenswert.

Bei ausschließlich proteomischer Betrachtung handelt es sich bei NME2 zudem um ein bereits beschriebenes TAA, welches sowohl in Untersuchungen an Astrozytomen (Schmits *et al.*, 2002), an der chronisch myeloischen Leukämie (Tschiedel *et al.*, 2008) als auch an der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (*Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, COPD) identifiziert wurde (Leidinger *et al.*, 2009). Mittels serologischer Untersuchungen von COPD-Patienten (Leidinger *et al.*, 2009) aber auch von Astrozytom-Patienten (WHO[°]II-[°]IV) (Schmits *et al.*, 2002) konnten überdies NME2- bzw. NM23-H2-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, wodurch es bereits als immunogenes Antigen im Rahmen einer humoralen B-Zell-Immunantwort beschrieben wurde (Leidinger *et al.*, 2009). Inwiefern NME2-Epitope jedoch als potentielle T-Zell-Zielstrukturen dienen oder Patienten spontane T-Zellantworten gegen diese aufweisen, wurde bisher noch nicht untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse, basierend auf einer *in silico*-Vorhersage potentieller Epitope sowie der Testung von SLPs mittels IFN- γ ELISpot in

IDH^{mut} LGG-Patienten, belegen Antigen-spezifische spontane T-Zellantworten in mehr als 25 % der Patienten und bestätigen damit das Potential von NME2 als T-Zell-Zielstruktur in einer Peptid-Vakzine.

5.2.2.5 Charakterisierung von TKT

Seit der Entdeckung des Warburg-Effekts bzw. der aeroben Glykolyse im Jahr 1924 stellen die Rolle des Zuckerstoffwechsels und der Energiegewinnung einen großer Schwerpunkt in der Krebsforschung dar (Gatenby und Gillies, 2004).

Das Enzym Transketolase (TKT) fungiert hierbei durch die Übertragung einer Ketolgruppe zwischen dem Xylulose-5-phosphat und dem Ribose-5-phosphat als eines der Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels und bildet gleichzeitig die direkte Verbindung zwischen der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg (*Pentose Phosphate Pathway*, PPP) (Schenk *et al.*, 1998). Beim PPP wird Glukose nicht anaerob zu Laktat vergäht, sondern es entsteht Ribose, welche *de novo* für die DNA/RNA-Synthese benötigt wird (Patra und Hay, 2014).

Man unterscheidet aktuell zwischen drei TKT-Proteinen: TKT, TKTL1 und TKTL2 (Coy *et al.*, 2005). Während die Rolle und Funktion von TKT noch relativ unbekannt ist, konnte für TKTL1 in Gliomen bereits eine malignitätsabhängige Expression festgestellt werden (Völker *et al.*, 2008).

Genexpressionsanalysen basierend auf dem umfangreichen IDH^{mut} LGG-Kollektiv der TCGA zeigten ausschließlich eine signifikant höhere *TKT*-Expression in WHO[°]III Oligodendrogliomen im Vergleich zu normalen Hirngeweben. Zwar zeigen auch WHO[°]II Oligodendrogliome sowie Astrozytome beider WHO-Grade tendenziell eine leicht erhöhte *TKT*-Expression, jedoch ohne signifikante Werte zu erreichen wodurch basierend auf unseren Daten nicht von einer Tumor-spezifischen *TKT*-Überexpression gesprochen werden kann. Ähnliche Beobachtungen in GBMs wurden auch von Kathagen *et al.* berichtet, welche ebenfalls eine nicht signifikant erhöhte Expression von PPP-relevanten Enzymen, darunter *TKT*, feststellen konnte (Kathagen *et al.*, 2013). Besonders die reziproke metabolische Umstellung zwischen der Glykolyse und dem PPP stellt offenbar besonders für GSCs eine Schlüsselfunktion für ihr Tumor-initierendes und aggressives Wachstum dar. Die Auswirkungen von Hypoxie und Normoxie auf GSCs führten zu der Annahme eines direkten Zusammenhangs zwischen Glykolyse und dem Migrationsverhalten sowie dem PPP und dem Proliferationsverhalten, bei dem es zu einer erhöhten Expression von *TKT* kommt (Kathagen *et al.*, 2013; Patra und Hay, 2014). Da die in dieser Arbeit untersuchten GSCs deutliche Unterschiede in der Proliferationsgeschwindigkeit zeigten, könnte dies daher ein Hinweis auf einen unterschiedlichen Metabolismus sein, welcher in schnell proliferierenden GSCs durch eine bevorzugte Energiegewinnung via PPP zu einer verstärkten Expression von TKT führen könnte (Kathagen *et al.*, 2013).

Die Relevanz dieser Erkenntnisse wird auch durch *in vitro*-Experimente an Kolorektalkarzinom- und Pankreaskarzinom-Zelllinien bestätigt, wobei gezeigt werden konnte, dass eine Inhibierung des Trans-

ketolase-Metabolismus zu einer reduzierten Proliferation der Krebszellen führt (Du *et al.*, 2004). Des Weiteren resultiert die totale Stilllegung des PPP durch gleichzeitigen Knock-down der Nrf2 regulierten Enzyme G6PD und TKT *in vitro* beispielsweise sogar in einer signifikanten Reduktion der Proliferationsgeschwindigkeit von Adenokarzinom-Zellen und verhinderte auch in Xenograft-Modelle ein *in vivo*-Wachstum des Tumors (Mitsuishi *et al.*, 2012).

In Anlehnung an unsere mRNA-Expressionsanalysen konnte auch auf Proteinebene in IDH^{mut} LGG-Tumorgewebe keine differenzielle TKT-Expression im Vergleich zu normalen Hirngewebe festgestellt werden. Semiquantitativ wurde TKT in > 95 % der Zellen (mit Ausnahme von Neuronen) festgestellt.

Basierend auf der Tatsache einer Tumor-unspezifischen mRNA- als auch Proteinexpression von TKT eignet sich dieses Antigen per Definition nicht als T-Zell-Zielstruktur in einer Peptid-Vakzine (Cheever *et al.*, 2009). Basierend auf dem bisherigen Wissen über die Rolle von TKT in der Energiegewinnung und über dessen Relevanz für das Proliferationsverhalten von Tumorzellen repräsentiert das Antigen jedoch auch in Gliomen ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung von spezifischen Inhibitoren.

Obwohl die Eignung von TKT als mögliche T-Zell-Zielstruktur für eine IDH^{mut} LGG Peptid-Vakzine vorerst nicht erbracht werden konnte, stellt die Interpretation der Immunogenität des Antigens eine große Herausforderung dar. Basierend auf der ubiquitären TKT-Expression im gesunden als auch malignen ZNS-Gewebe ist es daher sehr verwunderlich, dass mittels IFN- γ ELISpot Patientenspezifische spontane T-Zellantworten nachgewiesen werden konnten. TKT wurde daher im Verlauf dieser Arbeit weiter untersucht, um potentiell reaktive Epitope zu identifizieren und so überprüfen zu können, ob das Antigen tatsächlich von Antigen-spezifischen T-Zellen erkannt wird und zu spontanen T-Zellantworten führen kann. Zusätzlich sollte die Immunogenität des Antigens in einem größeren Kollektiv gesunder Probanden weiter untersucht werden, um die bisherigen Ergebnisse einer Patientenspezifischen Immunogenität mit Sicherheit bestätigen zu können.

5.3 Nachweis TAA-spezifischer zytotoxischer PBMTCs in IDH^{mut} LGG-Patienten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde durch die PF2D-IFN- γ ELISpot-Methode versucht, die Komplexität des Immunproteoms von IDH^{mut} LGGs sukzessiv zu reduzieren, was schließlich zur Identifizierung der immunogenen T-Zell-Zielstrukturen CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT führte. Die zusätzliche Charakterisierungen der onkogenen Eigenschaft und Spezifität der fünf Antigene im Zuge einer Eignungsbestimmung für die Verwendung in einer Peptid-Vakzine bestätigte das Potential von CRKII, CFL1, CNTN1 und NME2 (Cheever *et al.*, 2009). Obwohl TKT eine hohe Expression in IDH^{mut} LGG-Tumoren als auch in normalen Hirngeweben aufwies, wurde es aufgrund seiner Patienten-spezifischen Immunogenität weiter untersucht.

Basierend darauf zielten weitere Untersuchungen darauf ab, das Wissen um spezifische T-Zellepitope weiter zu verfeinern, um somit die reaktiven Epitope der zuvor beschriebenen immunogenen Antigene (n = 5) zu identifizieren. Im Folgenden werden daher die Ergebnisse der *in silico*-Vorhersage sowie die Validierung potentiell reaktiver Epitope diskutiert, welche letztlich dazu geführt haben, die Quantität von Antigen-spezifischen T-Zellen im Blut von HLA-A*02-positiven IDH^{mut} LGG-Patienten mittels HLA-A*02 iTAg-Tetrameren zu bestimmen.

5.3.1 Identifizierung reaktiver Epitope

Die Identifizierung von reaktiven Epitopen ist von entscheidender Bedeutung beim Nachweis von relevanten Zielstrukturen von T-Zellantworten und damit für die Entwicklung von Peptid-basierten Impfstoffen. Da dieses Verfahren jedoch, neben der bereits beschriebenen limitierten Verfügbarkeit von Patienten-spezifischen PBMCs, auch einen aufwendigen und kostenintensiven Prozess darstellt, konnte keine umfangreiche experimentelle Epitopkartierung für die identifizierten Antigene durchgeführt werden.

Basierend auf den bereits ermittelten immunogenen Peptidsequenzen von CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT, welche zuvor bereits als SLPs (50 AS) in einem umfangreichen IDH^{mut} LGG-Patienten Kollektiv validiert wurden, bezogen sich weitere *in silico*-Analysen auf die entsprechende 50 AS-Sequenz der Antigene. Im Gegensatz zu vorherigen *in silico*-Vorhersagen wurde die Prädiktion von reaktiven Epitopen auf den am häufigsten vorkommenden HLA-Typ (HLA-A*02) restringiert (Gonzalez-Galarza *et al.*, 2015). Diese Einschränkung wurde zum einen durch die hohe Frequenz HLA-A*02-positiver Patienten gewählt, zum anderen stellen HLA-A*02-restringierte Epitope aber auch die Voraussetzung für die Komplexierung mit den HLA-A*02 iTAg-Tetrameren dar, welche im Weiteren zum Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen verwendet wurden.

Die Epitop-Bestimmung von Okta-, Nona- und Dekamer-Peptiden wurde durch den NetMHCpan-Algo-

rithmus in Kombination mit der IEDB-Datenbank durchgeführt. Die Entscheidungsgrundlage für die Auswahl potentiell reaktiver Epitope bildete erneut die Kombination aus einer hohen Prozessierungs- bzw. Präsentationseffizienz (*Total Score*) und einer hohen Bindeaffinität ($IC_{50} < 500$ nM) der Epitope (Paul *et al.*, 2013). Darauf basierend konnten sowohl für CRKII, CFL1, NME2 als auch für TKT HLA-A*02-restringierte Epitope bestimmt und als *Synthetic Short Peptides* (SSPs) hergestellt werden. Für das CNTN1-SLP, welches sich als immunogenes Antigen validieren ließ, konnten jedoch keine HLA-A*02-restringierten Epitope bestimmt werden. Vielmehr zeigte sich hierbei, dass die immunogenen Sequenzbereiche dieses Peptids wahrscheinlich durch die Allele HLA-B*07:02 sowie HLA-A*11:01 präsentiert werden. Insgesamt konnten so jeweils zwei bis fünf potentiell reaktive Epitope pro Antigen bestimmt werden, die im Weiteren synthetisiert wurden und somit als SSPs für immunologische Untersuchungen zur Verfügung standen.

Die Immunogenität der potentiell reaktiven Epitope wurde erneut an einem altersangepassten Kollektiv aus IDH^{mut} LGG-Patienten bestimmt. Das Validierungskollektiv bestand sowohl aus HLA-A*02-positiven (n = 7) als auch HLA-A*02-negativen Patienten (n = 11), wodurch eine Beurteilung der HLA-A*02-restringierten Immunogenität der potentiell reaktiven Epitope möglich wurde. Diese beiden Voraussetzungen, sowie eine ausreichende Verfügbarkeit von PBMCs der Patienten, stellte eine große Herausforderung bei der Zusammenstellung des Kollektivs dar.

Untersuchungen an HLA-A*02-positiven Patienten mittels IFN- γ ELISpot zeigten eine besonders häufige Immunogenität (spontane IFN- γ T-Zellantworten in 25-57 % der getesteten Patienten) durch die reaktiven Epitope von CRKII und NME2. Zusätzlich zeigten die reaktiven Epitope von CRKII und NME2, aber auch die Epitope von TKT eine frequente Immunogenität in HLA-A*02-negativen Patienten. Im direkten Vergleich beider Patientengruppen wiesen vor allem HLA-A*02-positive Patienten eine signifikant stärkere T-Zellantwort gegen die reaktiven Epitope auf. Eine genauere Charakterisierung zeigte, dass besonders HLA-A*02-positive IDH^{mut} Astrozytom-Patienten eine signifikant stärkere und doppelt so hohe T-Zellantwort gegen die getesteten Epitope zeigten als vergleichsweise Patienten mit einem HLA-A*02-negativen Astrozytom oder HLA-A*02-positiven/-negativen Oligodendrogliom. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es sich bei den identifizierten reaktiven Epitopen um immundominante Zielstrukturen T-Zell-vermittelter Immunantworten in HLA-A*02-positiven IDH^{mut} LGG-Patienten handelt (Akram und Inman, 2012). Wie auch durch Schmitz *et al.* beschrieben, stellen solche HLA-A*02-restringierten immundominanten Peptidsequenzen, wie beispielsweise das von SOX11 abgeleitete Peptid "LLRRYN-VAKV", geeignete Zielstrukturen für eine T-Zell-basierte Immuntherapie bei GBMs dar (Schmitz *et al.*, 2007).

Die unterschiedliche Immunogenität in Astrozytom- bzw. Oligodendrogliom-Patienten konnte jedoch nicht eindeutig erklärt werden. Eine differenzielle Expression der Antigene konnte in beiden LGG-Subgruppen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ausgeschlossen werden. Zusätzlich zeigten

sich auch keine signifikanten Immunogenitätsunterschiede zwischen Astrozytom- bzw. Oligodendrogliom-Patienten bei der zuvor durchgeführten Validierung potentieller Antigenkandidaten (50-mer SLPs). Zur Klärung dieser Beobachtung bedarf es daher weiterer IFN- γ ELISpot-Analysen an einem größeren Kollektiv IDH^{mut}-Astrozytom- bzw. Oligodendrogliom-Patienten.

Durch die Erkenntnisse, dass sowohl HLA-A*02-positive als auch HLA-A*02-negative IDH^{mut} LGG-Patienten spontane IFN- γ -Antworten gegen die HLA-A*02-restringierten Epitope aufwiesen, stellte sich die Frage, welche Selektivität bzw. welche Promiskuität die reaktiven Epitope innerhalb der HLA-Klasse-I-Moleküle aufwiesen. Der Komplex, der zu T-Zellantworten führt, besteht unter anderem aus dem T-Zell-Rezeptor, dem bindenden Peptid sowie dem MHC-Klasse-I-Molekül, welches durch die genetische Variabilität und die entsprechende Tertiärstruktur der $\alpha 1/\alpha 2$ -Untereinheit der schweren Ketten die Antigen-spezifität definiert (Falk *et al.*, 1991; Matsumura *et al.*, 1992; Madden, 1995). Die Promiskuität der Epitope beschreibt daher die Freizügigkeit der Peptidpräsentation innerhalb verschiedener MHC-Klasse-I-Moleküle und bedeutet, ob bzw. in welchem Umfang bestimmte Peptidsequenzen die Eigenschaft aufweisen, auf mehreren HLA-Klasse-I-Molekülen gebunden und präsentiert zu werden. Sidney *et al.* etablierte hierfür bereits 1995 einen immunologischen Assay, der es ermöglicht, diese Promiskuität von Peptiden zu messen, was im Besonderen bei HLA-B-Molekülen zur Bestimmung eines sogenannten HLA-Subtypen mit ähnlicher Affinität zu übereinstimmenden Peptidsequenzen führte (dem sog. „B7-like-supermotiv“) (Sidney *et al.*, 1995). Darauf aufbauend konnte Frahm *et al.* zeigen, dass nur etwa 3 % aller viralen Peptide spezifisch und restringiert präsentiert werden (Frahm *et al.*, 2007). Dies verdeutlicht, dass besonders Epitope mit einer hohen Promiskuität für die Entwicklung von Immuntherapien eine große Relevanz aufweisen, da sie in der Rolle als mögliche T-Zell-Zielstrukturen in spezifischen Peptid-Vakzinen in einer Vielzahl von Individuen unabhängig der ethnischen Herkunft und Rücksicht auf die gegebene HLA-Polymorphie eingesetzt werden können (Sidney *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2016).

Die *in silico*-Untersuchungen der HLA-Klasse-I-Promiskuität unserer reaktiven Epitope geben bereits einen Hinweis auf ein gewisses Maß an HLA-Typ Unabhängigkeit der immunogenen Peptidsequenzen. Um dies jedoch vollständig experimentell bestätigen zu können, bedarf es weiteren Untersuchungen an einem umfangreicheren Patienten-Kollektiv, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt werden konnten. Die Bestätigung der Promiskuität der identifizierten reaktiven Epitope würde die Eignung der hier analysierten Antigene gegebenenfalls weiter unterstützen und deren Relevanz festigen.

Mit einer besonders hohen Immunogenitätsrate, d.h. durch den Nachweis von spontanen IFN- γ -T-Zell-Antworten in > 25 % aller HLA-A*02-positiven und -negativen IDH^{mut} LGG-Patienten, stellten besonders die bisher unbeschriebenen reaktiven Epitope von CRKII (RE10 CRKII ALALEVGEL), NME2 (RE15 NME2 MVWEGLNVV) und TKT (RE16 TKT FLAEAE LLNL) die Grundlage für weitere Untersuchungen dar.

Nachdem sich mittels IFN- γ ELISpot die funktionelle Immunogenität dieser Epitope bestätigen ließ,

stellte sich abschließend die Frage, in welchem Umfang das natürliche TCR-Repertoire von IDH^{mut} LGG-Patienten in der Lage ist, die eben beschriebenen TAAs durch Antigen-spezifische periphere T-Zellen zu erkennen und zu binden. Da Patienten ohne vorherige Peptid-Vakzinierung häufig nur sehr geringe Mengen an Antigen-spezifischen T-Zellen aufweisen (< 1 %) bedarf die Quantifizierung solcher Populationen einer großen Sensitivität der Methode und stellt daher eine große Herausforderung dar (Altman *et al.*, 1996). Hierbei repräsentieren sowohl *Peptide Major Histocompatibility Complex* (pMHC)-beladene Monomere als auch Tetramere gängige Standardmethoden, um spezifische T-Zellen nachzuweisen (Wooldridge *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurden HLA-A*02 iTAg-Tetramere verwendet, welche bei Beladung mit geeigneten Epitopen zur Komplexierung von bis zu vier TCRs führen und dadurch eine deutlich gesteigerte Stabilität der Tetramer/T-Zell-Bindung im Gegensatz zu den Monomeren aufweisen. Diese optimierte Stabilität ermöglicht besonders den Nachweis von Tumor-spezifischen Antigenen, welche durch die Erkennung von endogenen TAAs (nach der negativen Selektion im Thymus) (Delves und Roitt, 2009; Masopust und Schenkel, 2013; Klein *et al.*, 2014) häufig eine deutlich geringere Affinität zum MHC-Molekül aufweisen als beispielsweise Virus-spezifische T-Zellen (Aleksic *et al.*, 2012). Des Weiteren beinhalten iTAg-Tetramere eine patentierte Mutation (A245V) in der schweren Kette der $\alpha 3$ -Domäne des HLA-Klasse-I-Moleküls, welche zusätzlich unspezifische Bindungen mit dem CD8-Rezeptor von zytotoxischen T-Zellen verringern soll (Nugent *et al.*, 2005). Durch die gesteigerte Sensitivität sowie Spezifität ist es möglich, selbst T-Zellen mit einer geringen Häufigkeit sowie einer geringen Epitop-Affinität nachzuweisen, was besonders für das Verständnis von Tumor-spezifischen Immunantworten eine große Rolle spielt (Wooldridge *et al.*, 2009). Diese geringe Affinität der T-Zellen zu TAAs, die zum Schutz vor Autoimmunität dient, stellt möglicherweise eine Erklärung für die „*Tumor-Escape*“-Mechanismen dar und könnte der Grund sein, warum die bisherige Entwicklung von TAA-Vakzinierungen scheiterten (Dunn *et al.*, 2004; Aleksic *et al.*, 2012).

In der vorliegenden Arbeit erbrachte der Einsatz von RE10 CRKII (ALALEVGEL)-, RE15 NME2 (MVWEGLVV)- sowie RE16 TKT (FLAEAELLNL)-beladenen, HLA-A*02 iTAg-Tetrameren in erster Linie, methodenunabhängig vom IFN- γ ELISpot, den direkten Nachweis für die spezifische Erkennung und Bindung der Antigene sowie die Bestimmung der Häufigkeit Antigen-spezifischer T-Zellen. Hierbei konnten im Rahmen dieser Arbeit Antigen-spezifische cytotoxische T-Zell-Populationen in beinahe allen IDH^{mut} LGG-Patienten gegen die reaktiven Epitope RE10 CRKII (mediane Frequenz: 0,55 %), RE15 NME2 (mediane Frequenz: 0,26 %) sowie RE16 TKT (mediane Frequenz: 0,44 %) bestimmt werden. Zwar konnte die Frequenz der Antigen-spezifischen T-Zellen bestimmt werden, jedoch lässt der Einsatz von Antigen-beladenen Tetrameren keine Aussage über die tatsächliche Bindeaffinität der T-Zellen zum Antigen zu. Weiterführende Untersuchungen sollten sich daher mit der funktionellen Charakterisierung der Tumor-spezifischen T-Zellen beschäftigen. So wären alternative Färbungen denkbar, wodurch zusätzlich die Zytokinsekretion als auch der funktionelle Status der T-Zellen bzgl. Aktivierungs- und Exhaustion-Marker genauer untersucht werden könnte (Pittet *et al.*, 2001; Drake *et al.*, 2005).

Durch die mittels FACS-Sortierung durchgeführte Vereinzelung bzw. Sammlung der mit den Antigen-beladenen HLA-A*02 iTAg-Tetrameren-komplexierten T-Zellen wurde bereits jetzt die Grundlage für eine mögliche TCR-Sequenzierung geschaffen (Dössinger *et al.*, 2013). Diese Methode ermöglicht es, die entsprechenden TCR-Sequenzen zu bestimmen, welche im Weiteren mit dem TCR-Repertoire von PBMTCs oder TILs verglichen werden könnten, um die Klonalität zu bestimmen und damit den Nachweis über eine Tumor-spezifische Infiltration zu erbringen (Han *et al.*, 2014). Wie erst kürzlich von Hsu *et al.* beschrieben wurde, lassen sich somit Veränderungen im T-Zell-Repertoire als Folge einer DC-Vakzinierung effektiv nachverfolgen, welche zudem Hinweise auf Antigen-spezifische T-Zellantworten und eine damit verbundene verbesserte Überlebensprognose der Patienten gaben (Hsu *et al.*, 2016). Diese Analyse konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit jedoch noch nicht durchgeführt werden, da die Sensitivität der Methode bislang nicht ausreicht, um die TCR-Sequenz der gesammelten Tetramer-positiven T-Zellen aufgrund einer zu geringen Zellzahl zu bestimmen (Kirsch *et al.*, 2015).

Die hier erbrachten Nachweise über funktionelle IFN- γ T-Zell-Antworten sowie der quantitative Nachweis von Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Populationen zeigen deutlich, dass es sich bei den identifizierten Antigenen CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT, bzw. den HLA-A*02-restringierten reaktiven Epitopen RE10 CRKII (ALALEVGEL), RE15 NME2 (MVWEGLNVV) sowie RE16 TKT (FLAEAEELLNL) um Zielstrukturen handelt, welche durch das natürliche Repertoire von T-Zellen in IDH^{mut}-LGG erkannt werden und zu Patienten-spezifischen spontanen Immunantworten führen.

Zusammenfassend stellt die vorliegende Arbeit, nach aktuellem Stand des Wissens, die erste umfangreiche immunproteomische Untersuchung von IDH^{mut} LGGs dar. Hierbei führte die systematische Kombination der PF2D-IFN- γ ELISpot-Methode zur direkten massenspektrometrischen Identifizierung von CRKII, CFL1, CNTN1, NME2 und TKT als immunogene und bisher unbeschriebene TAAs für diese biologisch und klinisch definierte Gliom-Subklasse.

Obwohl auch TKT nachweislich über eine Patienten-spezifische Immunogenität sowie Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Populationen verfügt, konnte die Eignung des TAAs als T-Zell-Zielstruktur aufgrund fehlender Tumor-spezifische mRNA- und Proteinexpression vorerst nicht bestätigt werden.

Umfangreiche Charakterisierungsschritte erbrachten jedoch die nötigen Nachweise, wodurch sich die Antigene CRKII, CFL1, CNTN1 und NME2, basierend auf ihrer hohen Immunogenität, ihrer onkogenen Eigenschaften als auch ihrer Tumorspezifität, als potentielle Zielstrukturen für eine T-Zell-basierte Immunotherapie eignen würden. Durch die spezifische Expression in IDH^{mut} LGG-Tumoren als auch auf IDH^{mut} GSCs eignen sich die Antigene besonders für die Entwicklung von bspw. personalisierten immuntherapeutischen Ansätzen, um die inter- und intratumorale Heterogenität der Tumore gezielt adressieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit konnten zudem die reaktiven Epitope der Antigene CRKII und NME2 identifiziert werden, welche unter anderem immundominante Zielstrukturen für spontane T-Zellantworten

darstellen und im Zuge einer Multipeptid-Vakzine vermutlich zu einer potenzierten Immunantwort bei IDH^{mut}-LGG-Patienten führen könnten. Für die Entwicklung einer spezifischen TAA-Vakzine für die Therapie von IDH^{mut} LGG-Patienten sollten die hier beschriebene therapeutische Relevanz der Antigene daher unbedingt weiter verfolgt werden.

Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J. (2002), 'Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability*', *Journal of Anatomy* **200**(6), 629–638.
- Abbott, N. J., Ronnback, L. und Hansson, E. (2006), 'Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier', *Nature Reviews Neuroscience* **7**(1), 41–53.
- Agarwal, S., Manchanda, P., Vogelbaum, M. A., Ohlfest, J. R. und Elmquist, W. F. (2013), 'Function of the blood-brain barrier and restriction of drug delivery to invasive glioma cells: findings in an orthotopic rat xenograft model of glioma.', *Drug Metabolism and Disposition* **41**(1), 33–39.
- Ahmadi, R., Rezvan, A., Dictus, C., Christine, D., Hartmann, C., Christian, H., Zürn, O., Olga, Z., Edler, L., Lutz, E., Hartmann, M., Marius, H., Combs, S., Stephanie, C., Herold-Mende, C., Christel, H.-M., Wirtz, C. R., Rainer, W. C., Unterberg, A. und Andreas, U. (2009), 'Long-term outcome and survival of surgically treated supratentorial low-grade glioma in adult patients.', *Acta neurochirurgica* **151**(11), 1359–1365.
- Ahmed, N., Salsman, V. S., Kew, Y., Shaffer, D., Powell, S., Zhang, Y. J., Grossman, R. G., Heslop, H. E. und Gottschalk, S. (2010), 'HER2-Specific T Cells Target Primary Glioblastoma Stem Cells and Induce Regression of Autologous Experimental Tumors', *Clinical cancer research* **16**(2), 474–485.
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., McNagny, K. M. und Rossi, F. M. V. (2011), 'Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool', *Nature Neuroscience* **14**(9), 1142–1149.
- Akram, A. und Inman, R. D. (2012), 'Immunodominance: a pivotal principle in host response to viral infections.', *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **143**(2), 99–115.
- Aktas, O., Smorodchenko, A., Brocke, S., Infante-Duarte, C., Topphoff, U. S., Vogt, J., Prozorovski, T., Meier, S., Osmanova, V., Pohl, E., Bechmann, I., Nitsch, R. und Zipp, F. (2005), 'Neuronal Damage in Autoimmune Neuroinflammation Mediated by the Death Ligand TRAIL', *Neuron* **46**(3), 421–432.
- Al-Shibli, K. I., Donnem, T., Al-Saad, S., Persson, M., Bremnes, R. M. und Busund, L.-T. (2008), 'Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer.', *Clinical cancer research* **14**(16), 5220–5227.

- Aleksic, M., Liddy, N., Molloy, P. E., Pumphrey, N., Vuidepot, A., Chang, K.-M. und Jakobsen, B. K. (2012), 'Different affinity windows for virus and cancer-specific T-cell receptors: Implications for therapeutic strategies', *European journal of immunology* **42**(12), 3174–3179.
- Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J. und Davis, M. M. (1996), 'Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.', *Science* **274**(5284), 94–96.
- Amendola, R., Martinez, R., Negroni, A., Venturelli, D., Tanno, B., Calabretta, B. und Raschellà, G. (1997), 'DR-nm23 gene expression in neuroblastoma cells: relationship to integrin expression, adhesion characteristics, and differentiation.', *Journal of the National Cancer Institute* **89**(17), 1300–1310.
- Amir, A. L., van der Steen, D. M., Hagedoorn, R. S., Kester, M. G. D., van Bergen, C. A. M., Drijfhout, J. W., de Ru, A. H., Falkenburg, J. H. F., van Veelen, P. A. und Heemskerk, M. H. M. (2011), 'Allo-HLA-reactive T cells inducing graft-versus-host disease are single peptide specific', *Blood* **118**(26), 6733–6742.
- Andersen, M. H., Pedersen, L. O., Capeller, B., Brocker, E. B., Becker, J. C. und Straten, P. T. (2001), 'Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients', *Cancer research* **61**(16), 5964–5968.
- Ardon, H., De Vleeschouwer, S., Van Calenbergh, F., Claes, L., Kramm, C. M., Rutkowski, S., Wolff, J. E. A. und Van Gool, S. W. (2010), 'Adjuvant dendritic cell-based tumour vaccination for children with malignant brain tumours.', *Pediatric blood & cancer* **54**(4), 519–525.
- Ardon, H., Van Gool, S. W., Verschuere, T., Maes, W., Fieuws, S., Sciot, R., Wilms, G., Demaerel, P., Goffin, J., Van Calenbergh, F., Menten, J., Clement, P., Debiec-Rychter, M. und De Vleeschouwer, S. (2012), 'Integration of autologous dendritic cell-based immunotherapy in the standard of care treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma: results of the HGG-2006 phase I/II trial.', *Cancer Immunology, Immunotherapy* **61**(11), 2033–2044.
- Aretz, S., Krohne, T. U., Kammerer, K., Warnken, U., Hotz-Wagenblatt, A., Bergmann, M., Stanzel, B. V., Kempf, T., Holz, F. G., Schnölzer, M. und Kopitz, J. (2013), 'In-depth mass spectrometric mapping of the human vitreous proteome.', *Proteome Science* **11**(1), 22.
- Askenasy, N., Yolcu, E. S., Yaniv, I. und Shirwan, H. (2005), 'Induction of tolerance using Fas ligand: a double-edged immunomodulator', *Blood* **105**(4), 1396–1404.
- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J. C. R., Kleinman, H. K., Marinkovich, M. P., Martin, G. R., Mayer, U., Meneguzzi, G., Miner, J. H., Miyazaki, K., Patarroyo, M., Paulsson, M., Quaranta, V., Sanes, J. R.,

- Sasaki, T., Sekiguchi, K., Sorokin, L. M., Talts, J. F., Tryggvason, K., Uitto, J., Virtanen, I., von der Mark, K., Wewer, U. M., Yamada, Y. und Yurchenco, P. D. (2005), 'A simplified laminin nomenclature.', *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* **24**(5), 326–332.
- Baba, H., Urano, T., Okada, K., Furukawa, K., Nakayama, E., Tanaka, H., Iwasaki, K. und Shiku, H. (1995), 'Two isotypes of murine nm23/nucleoside diphosphate kinase, nm23-M1 and nm23-M2, are involved in metastatic suppression of a murine melanoma line.', *Cancer research* **55**(9), 1977–1981.
- Badie, B., Schartner, J., Prabakaran, S., Paul, J. und Vorpahl, J. (2001), 'Expression of Fas ligand by microglia: possible role in glioma immune evasion.', *Journal of Neuroimmunology* **120**(1-2), 19–24.
- Bailey, P. und Cushing, H. (1928), 'A classification of the tumors of the glioma group on a histogenic basis with a correlated study of prognosis'.
- Banks, W. A. (2009), 'Characteristics of compounds that cross the blood-brain barrier.', *BMC neurology* **9 Suppl 1**, S3.
- Barker, C. F. und Billingham, R. E. (1977), 'Immunologically privileged sites.', *Advances in immunology* **25**, 1–54.
- Bartsch, U. (2003), 'Neural CAMS and their role in the development and organization of myelin sheaths.', *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **8**, d477–90.
- Basha, G., Lizée, G., Reinicke, A. T., Seipp, R. P., Omilusik, K. D. und Jefferies, W. A. (2008), 'MHC Class I Endosomal and Lysosomal Trafficking Coincides with Exogenous Antigen Loading in Dendritic Cells', *PLoS ONE* **3**(9), e3247.
- Basha, G., Omilusik, K., Chavez-Steenbock, A., Reinicke, A. T., Lack, N., Choi, K. B. und Jefferies, W. A. (2012), 'A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway', *Nature immunology* **13**(3), 237–245.
- Beck, B. und Blanpain, C. (2013), 'Unravelling cancer stem cell potential', *Nature Reviews Cancer* **13**(10), 727–738.
- Beckhove, P., Warta, R., Lemke, B., Stoycheva, D., Momburg, F., Schnölzer, M., Warnken, U., Schmitz-Winnenthal, H., Ahmadi, R., Dyckhoff, G., Bucur, M., Jünger, S., Schueler, T., Lennerz, V., Woelfel, T., Unterberg, A. und Herold-Mende, C. (2010), 'Rapid T cell-based identification of human tumor tissue antigens by automated two-dimensional protein fractionation.', *Journal of Clinical Investigation* **120**(6), 2230–2242.
- Berberich, S. J. und Postel, E. H. (1995), 'PuF/NM23-H2/NDPK-B transactivates a human c-myc promoter-CAT gene via a functional nuclease hypersensitive element.', *Oncogene* **10**(12), 2343–2347.

- Bergers, G. und Song, S. (2005), 'The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance.', *Neuro-Oncology* **7**(4), 452–464.
- Bernstein, B. W. und Bamburg, J. R. (2010), 'ADF/Cofilin: a functional node in cell biology', *Trends in Cell Biology* **20**(4), 187–195.
- Bilate, A. M. und Lafaille, J. J. (2012), 'Induced CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells in Immune Tolerance', *dx.doi.org* **30**(1), 733–758.
- Biswas, S. K. und Mantovani, A. (2010), 'Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm.', *Nature immunology* **11**(10), 889–896.
- Bleier, B. S., Kohman, R. E., Feldman, R. E., Ramanlal, S. und Han, X. (2013), 'Permeabilization of the Blood-Brain Barrier via Mucosal Engrafting: Implications for Drug Delivery to the Brain', *PLoS ONE* **8**(4), e61694.
- Bloch, O., Crane, C. A., Kaur, R., Safaee, M., Rutkowski, M. J. und Parsa, A. T. (2013), 'Gliomas Promote Immunosuppression through Induction of B7-H1 Expression in Tumor-Associated Macrophages', *Clinical cancer research* **19**(12), 3165–3175.
- Blum, J. S., Wearsch, P. A. und Cresswell, P. (2013), 'Pathways of Antigen Processing', **31**(1), 443–473.
- Bot, A. (2015), 'Target discovery for T cell therapy: Next steps to advance Immunotherapies', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* **3**(1), 31.
- Bourkoula, E., Mangoni, D., Ius, T., Pucer, A., Isola, M., Musiello, D., Marzinotto, S., Toffoletto, B., Sorrentino, M., Palma, A., Caponnetto, F., Gregoraci, G., Vindigni, M., Pizzolitto, S., Falconieri, G., De Maglio, G., Pecile, V., Ruaro, M. E., Gri, G., Parisse, P., Casalis, L., Scoles, G., Skrap, M., Beltrami, C. A., Beltrami, A. P. und Cesselli, D. (2014), 'Glioma-associated stem cells: a novel class of tumor-supporting cells able to predict prognosis of human low-grade gliomas.', *Stem Cells* **32**(5), 1239–1253.
- Brat, D. J., Verhaak, R. G. W., Al-dape, K. D., Yung, W. K. A., Salama, S. R., Cooper, L. A. D., Rheinbay, E., Miller, C. R., Vitucci, M., Morozova, O., Robertson, A. G., Noushmehr, H., Laird, P. W., Cherniack, A. D., Akbani, R., Huse, J. T., Ciriello, G., Poisson, L. M., Barnholtz-Sloan, J. S., Berger, M. S., Brennan, C., Colen, R. R., Colman, H., Flanders, A. E., Giannini, C., Grifford, M., Iavarone, A., Jain, R., Joseph, I., Kim, J., Kasaiian, K., Mikkelsen, T., Murray, B. A., O'Neill, B. P., Pachter, L., Parsons, D. W., Sougnez, C., Sulman, E. P., Vandenberg, S. R., Van Meir, E. G., von Deimling, A., Zhang, H., Crain, D., Lau, K., Mallery, D., Morris, S., Paulauskis, J., Penny, R., Shelton, T., Sherman, M., Yena, P., Black, A., Bowen, J., Dicostanzo, K., Gastier-Foster, J., Leraas, K. M., Lichtenberg, T. M., Pierson, C. R., Ramirez, N. C., Taylor, C., Weaver, S., Wise, L., Zmuda, E., Davidsen, T., Demchok, J. A., Eley, G., Ferguson, M. L., Hutter, C. M., Shaw, K. R. M., Ozenberger, B. A., Sheth, M., Sofia, H. J., Tarnuzzer,

- R., Wang, Z., Yang, L., Zenklusen, J. C., Ayala, B., Baboud, J., Chudamani, S., Jensen, M. A., Liu, J., Pihl, T., Raman, R., Wan, Y., Wu, Y., Ally, A., Auman, J. T., Balasundaram, M., Balu, S., Baylin, S. B., Beroukhi, R., Bootwalla, M. S., Bowlby, R., Bristow, C. A., Brooks, D., Butterfield, Y., Carlsen, R., Carter, S., Chin, L., Chu, A., Chuah, E., Cibulskis, K., Clarke, A., Coetzee, S. G., Dhalla, N., Fennell, T., Fisher, S., Gabriel, S., Getz, G., Gibbs, R., Guin, R., Hadjipanayis, A., Hayes, N., Hinoue, T., Hoadley, K., Holt, R. A., Hoyle, A. P., Jefferys, S. R., Jones, S., Jones, C. D., Kucherlapati, R., Lai, P. H., Lander, E., Lee, S., Lichtenstein, L., Ma, Y., Maglinte, D. T., Mahadeshwar, H. S., Marra, M. A., Mayo, M., Meng, S., Meyerson, M. L., Mieczkowski, P. A., Moore, R. A., Mose, L. E., Mungall, A. J., Pantazi, A., Parfenov, M., Park, P. J., Parker, J. S., Perou, C. M., Proto-Popov, A., Ren, X., Roach, J., Sabedot, T. S., Schein, J., Schumacher, S. E., Seidman, J. G., Seth, S., Shen, H., Simons, J. V., Sipahimalani, P., Soloway, M. G., Song, X., Sun, H., Tabak, B., Tam, A., Tan, D., Tang, J., Thiessen, N., Triche, T. J., Van Den Berg, D. J., Veluvolu, U., Waring, S., Weisenberger, D. J., Wilkerson, M. D., Wong, T., Wu, J., Xi, L., Xu, A. W., Yang, L., Zack, T. I., Zhang, J., Aksoy, B. A., Arachchi, H., Benz, C., Bernard, B., Carlin, D., Cho, J., DiCara, D., Frazer, S., Fuller, G. N., Gao, J., Gehlenborg, N., Hausler, D., Heiman, D. I., Iype, L., Jacobsen, A., Ju, Z., Katzman, S., Kim, H., Knijnenburg, T., Kreisberg, R. B., Lawrence, M. S., Lee, W., Leinonen, K., Lin, P., Ling, S., Liu, W., Liu, Y., Liu, Y., Lu, Y., Mills, G., Ng, S., Noble, M. S., Paull, E., Rao, A., Reynolds, S., Saksena, G., Sanborn, Z., Sander, C., Schultz, N., Senbabaoglu, Y., Shen, R., Shmulevich, I., Sinha, R., Stuart, J., Sumer, O., Sun, Y., Tasman, N., Taylor, B. S., Voet, D., Weinhold, N., Weinstein, J. N., Yang, D., Yoshihara, K., Zheng, S., Zhang, W., Zou, L., Abel, T., Sadeghi, S., Cohen, M. L., Eschbacher, J., Hattab, E. M., Raghunathan, A., Schiederjan, M. J., Aziz, D., Barnett, G., Barrett, W., Bigner, D. D., Boice, L., Brewer, C. und Calatozzolo, C. a. (2015), 'Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas', *New England Journal of Medicine* **372**(26), 2481–2498.
- Brennan, C. W., Verhaak, R. G. W., McKenna, A., Campos, B., Nounshmehr, H., Salama, S. R., Zheng, S., Chakravarty, D., Sanborn, J. Z., Berman, S. H., Beroukhi, R., Bernard, B., Wu, C.-J., Genovese, G., Shmulevich, I., Barnholtz-Sloan, J., Zou, L., Vegesna, R., Shukla, S. A., Ciriello, G., Yung, W. K., Zhang, W., Sougnez, C., Mikkelsen, T., Aldape, K., Bigner, D. D., Van Meir, E. G., Prados, M., Sloan, A., Black, K. L., Eschbacher, J., Finocchiaro, G., Friedman, W., Andrews, D. W., Guha, A., Iacocca, M., O'Neill, B. P., Foltz, G., Myers, J., Weisenberger, D. J., Penny, R., Kucherlapati, R., Perou, C. M., Hayes, D. N., Gibbs, R., Marra, M., Mills, G. B., Lander, E., Spellman, P., Wilson, R., Sander, C., Weinstein, J., Meyerson, M., Gabriel, S., Laird, P. W., Haussler, D., Getz, G., Chin, L. und Network, T. R. (2013), 'The somatic genomic landscape of glioblastoma.', *Cell* **155**(2), 462–477.
- Bretscher, P. A. (1999), 'A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells.', *PNAS* **96**(1), 185–190.
- Brown, C. E., Starr, R., Aguilar, B., Shami, A. F., Martinez, C., D'Apuzzo, M., Barish, M. E., Forman, S. J.

- und Jensen, M. C. (2012), 'Stem-like Tumor-Initiating Cells Isolated from IL13R 2 Expressing Gliomas Are Targeted and Killed by IL13-Zetakine-Redirected T Cells', *Clinical cancer research* **18**(8), 2199–2209.
- Burkhard, C., Di Patre, P.-L., Schüler, D., Schüler, G., Yasargil, M. G., Yonekawa, Y., Lütolf, U. M., Kleihues, P. und Ohgaki, H. (2003), 'A population-based study of the incidence and survival rates in patients with pilocytic astrocytoma.', *Journal of neurosurgery* **98**(6), 1170–1174.
- Butt, A. M., Jones, H. C. und Abbott, N. J. (1990), 'Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study.', *The Journal of Physiology* **429**, 47–62.
- Campos, B., Wan, F., Farhadi, M., Ernst, A., Zeppernick, F., Tagscherer, K. E., Ahmadi, R., Lohr, J., Dictus, C., Gdynia, G., Combs, S. E., Goidts, V., Helmke, B. M., Eckstein, V., Roth, W., Beckhove, P., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B. und Herold-Mende, C. (2010), 'Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells.', *Clinical cancer research* **16**(10), 2715–2728.
- Candolfi, M., Curtin, J. F., Yagiz, K., Assi, H., Wibowo, M. K., Alzadeh, G. E., Foulad, D., Muhammad, A. K. M. G., Salehi, S., Keech, N., Puntel, M., Liu, C., Sanderson, N. R., Kroeger, K. M., Dunn, R., Martins, G., Lowenstein, P. R. und Castro, M. G. (2011), 'B cells are critical to T-cell-mediated antitumor immunity induced by a combined immune-stimulatory/conditionally cytotoxic therapy for glioblastoma.', *Neoplasia (New York, N.Y.)* **13**(10), 947–960.
- Canoll, P. und Goldman, J. E. (2008), 'The interface between glial progenitors and gliomas', *Acta neuropathologica* **116**(5), 465–477.
- Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D. und Ploix, C. C. (2006), 'CNS immune privilege: hiding in plain sight.', *Immunological reviews* **213**, 48–65.
- Caruso, D. A., Orme, L. M., Neale, A. M., Radcliff, F. J., Amor, G. M., Maixner, W., Downie, P., Hassall, T. E., Tang, M. L. K. und Ashley, D. M. (2004), 'Results of a phase 1 study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children and young adults with brain cancer.', *Neuro-Oncology* **6**(3), 236–246.
- Castriconi, R., Daga, A., Dondero, A., Zona, G., Poliani, P. L., Melotti, A., Griffiero, F., Marubbi, D., Spaziante, R., Bellora, F., Moretta, L., Moretta, A., Corte, G. und Bottino, C. (2009), 'NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties.', *The Journal of Immunology* **182**(6), 3530–3539.
- Castro, M. A. A., Dal Pizzol, F., Zdanov, S., Soares, M., Müller, C. B., Lopes, F. M., Zanotto Filho, A., Fernandes, M. d. C., Moreira, J. C. F., Shacter, E. und Klamt, F. (2010), 'CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in nonsmall cell lung cancer', *Cancer* **116**(15), 3645–3655.

- Cavani, A., Nasorri, F., Prezzi, C., Sebastiani, S., Albanesi, C. und Girolomoni, G. (2000), 'Human CD4+ T Lymphocytes with Remarkable Regulatory Functions on Dendritic Cells and Nickel-Specific Th1 Immune Responses', *Journal of Investigative Dermatology* **114**(2), 295–302.
- Ceccarelli, M., Barthel, F. P., Malta, T. M. und Sabedot, T. S. (2016), 'Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma', *Cell*.
- Chamorro, Á., Meisel, A., Planas, A. M., Urra, X., van de Beek, D. und Veltkamp, R. (2012), 'The immunology of acute stroke', *Nature Reviews Neurology* **8**(7), 401–410.
- Chan, A. K.-Y., Yao, Y., Zhang, Z., Shi, Z., Chen, L., Chung, N. Y.-F., Liu, J. S.-M., Li, K. K.-W., Chan, D. T.-M., Poon, W. S., Wang, Y., Zhou, L. und Ng, H.-K. (2015), 'Combination genetic signature stratifies lower-grade gliomas better than histological grade.', *Oncotarget* **6**(25), 20885–20901.
- Chan, W. Y., Kohsaka, S. und Rezaie, P. (2007), 'The origin and cell lineage of microglia—New concepts', *Brain Research Reviews* **53**(2), 344–354.
- Chang, N. C., Hung, S. I., Hwa, K. Y., Kato, I., Chen, J. E., Liu, C. H. und Chang, A. C. (2001), 'A macrophage protein, Ym1, transiently expressed during inflammation is a novel mammalian lectin.', *Journal of Biological Chemistry* **276**(20), 17497–17506.
- Chaput, N., Louafi, S., Bardier, A., Charlotte, F., Vaillant, J.-C., Ménégau, F., Rosenzweig, M., Lemoine, F., Klatzmann, D. und Taieb, J. (2009), 'Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue.', *Gut* **58**(4), 520–529.
- Charoentong, P., Angelova, M., Efremova, M., Gallasch, R., Hackl, H., Galon, J. und Trajanoski, Z. (2012), 'Bioinformatics for cancer immunology and immunotherapy.', *Cancer Immunology, Immunotherapy* **61**(11), 1885–1903.
- Chatenoud, L. und Bach, J.-F. (2006), 'Adaptive human regulatory T cells: myth or reality?', *Journal of Clinical Investigation* **116**(9), 2325–2327.
- Cheever, M. A., Allison, J. P., Ferris, A. S., Finn, O. J., Hastings, B. M., Hecht, T. T., Mellman, I., Prindiville, S. A., Viner, J. L., Weiner, L. M. und Matrisian, L. M. (2009), 'The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research.', *Clinical cancer research* **15**(17), 5323–5337.
- Chen, L. und Flies, D. B. (2013), 'Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition', *Nature reviews. Immunology* **13**(4), 227–242.
- Chen, X. und Jensen, P. E. (2004), 'The expression of HLA-DO (H2-O) in B lymphocytes', *Immunologic research* **29**(1-3), 19–28.

- Cherry, J. D., Olschowka, J. A. und O'Banion, M. K. (2014), 'Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed.', *Journal of Neuroinflammation* **11**(1), 98.
- Chhor, V., Le Charpentier, T., Lebon, S., Oré, M.-V., Celador, I. L., Josserand, J., Degos, V., Jacotot, E., Hagberg, H., Sävman, K., Mallard, C., Gressens, P. und Fleiss, B. (2013), 'Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro', *Brain, behavior, and immunity* **32**, 70–85.
- Choi, C., Park, J. Y., Lee, J., Lim, J. H., Shin, E. C., Ahn, Y. S., Kim, C. H., Kim, S. J., Kim, J. D., Choi, I. S. und Choi, I. H. (1999), 'Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFN-gamma.', *Journal of Immunology* **162**(4), 1889–1895.
- Chow, A., Toomre, D., Garrett, W. und Mellman, I. (2002), 'Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane', *Nature* **418**(6901), 988–994.
- Chow, K. K., Naik, S., Kakarla, S., Brawley, V. S., Shaffer, D. R., Yi, Z., Rainusso, N., Wu, M.-F., Liu, H., Kew, Y., Grossman, R. G., Powell, S., Lee, D., Ahmed, N. und Gottschalk, S. (2012), 'T Cells Redirected to EphA2 for the Immunotherapy of Glioblastoma', *Molecular Therapy* **21**(3), 629–637.
- Chung, B. M., Dimri, M., George, M., Reddi, A. L., Chen, G., Band, V. und Band, H. (2009), 'The role of cooperativity with Src in oncogenic transformation mediated by non-small cell lung cancer-associated EGF receptor mutants', *Oncogene* **28**(16), 1821–1832.
- Collins, V. P., Jones, D. T. W. und Giannini, C. (2015), 'Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers.', *Acta neuropathologica* **129**(6), 775–788.
- Copland, D. A., Calder, C. J., Raveney, B. J. E., Nicholson, L. B., Phillips, J., Cherwinski, H., Jenmalm, M., Sedgwick, J. D. und Dick, A. D. (2007), 'Monoclonal Antibody-Mediated CD200 Receptor Signaling Suppresses Macrophage Activation and Tissue Damage in Experimental Autoimmune Uveoretinitis', *The American Journal of Pathology* **171**(2), 580–588.
- Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P. und Boon, T. (2014), 'Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy.', *Nature Reviews Cancer* **14**(2), 135–146.
- Coy, J. F., Dressler, D., Wilde, J. und Schubert, P. (2005), 'Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer.', *Clinical laboratory* **51**(5-6), 257–273.
- Crawford, A. und Wherry, E. J. (2009), 'The diversity of costimulatory and inhibitory receptor pathways and the regulation of antiviral T cell responses.', *Current opinion in immunology* **21**(2), 179–186.

- Crawford, M. P., Yan, S. X., Ortega, S. B., Mehta, R. S., Hewitt, R. E., Price, D. A., Stastny, P., Douek, D. C., Koup, R. A., Racke, M. K. und Karandikar, N. J. (2004), 'High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8⁺ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay', *Blood* **103**(11), 4222–4231.
- Cresswell, P., Ackerman, A. L., Giodini, A., Peaper, D. R. und Wearsch, P. A. (2005), 'Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation', *Immunological reviews* **207**(1), 145–157.
- Czopka, T., von Holst, A., French Constant, C. und Faissner, A. (2010), 'Regulatory Mechanisms that Mediate Tenascin C-Dependent Inhibition of Oligodendrocyte Precursor Differentiation', *Journal of Neuroscience* **30**(37), 12310–12322.
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A. und Barres, B. A. (2010), 'Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis', *Nature* **468**(7323), 562–566.
- Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., Fantin, V. R., Jang, H. G., Jin, S., Keenan, M. C., Marks, K. M., Prins, R. M., Ward, P. S., Yen, K. E., Liao, L. M., Rabinowitz, J. D., Cantley, L. C., Thompson, C. B., Vander Heiden, M. G. und Su, S. M. (2009), 'Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate', *Nature* **462**(7274), 739–744.
- David, S. und Kroner, A. (2011), 'Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury', *Nature Reviews Neuroscience* **12**(7), 388–399.
- Davis, M. M. und Bjorkman, P. J. (1988), 'T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition', *Nature* **334**(6181), 395–402.
- Delves, P. J. und Roitt, I. M. (2009), 'The Immune System', *dx.doi.org* **343**(1), 37–49.
- Dennis, G., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C. und Lempicki, R. A. (2003), 'DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery.', *Genome biology* **4**(5), P3.
- Dick, A. D., Siepmann, K., Dees, C., Duncan, L., Broderick, C., Liversidge, J. und Forrester, J. V. (1999), 'Fas–Fas Ligand–Mediated Apoptosis within Aqueous during Idiopathic Acute Anterior Uveitis', *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **40**(10), 2258–2267.
- Dirks, P. B. (2010), 'Brain tumor stem cells: The cancer stem cell hypothesis writ large', *Molecular Oncology* **4**(5), 420–430.
- Domingues, P., González-Tablas, M., Otero, A., Pascual, D., Miranda, D., Ruiz, L., Sousa, P., Ciudad, J., Gonçalves, J. M., Lopes, M. C., Orfao, A. und Tabernero, M. D. (2016), 'Tumor infiltrating immune cells in gliomas and meningiomas', *Brain, behavior, and immunity* **53**, 1–15.

- Dominguez, R. und Holmes, K. C. (2011), 'Actin Structure and Function', *Annual Review of Biophysics* **40**(1), 169–186.
- Dong, C., Martinez, G. J. und Bordon, Y. (2010), 'T cells: the usual subsets'.
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V. A., Celis, E. und Chen, L. (2002), 'Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion.', *Nature Medicine* **8**(8), 793–800.
- Dorward, I. G., Luo, J., Perry, A., Gutmann, D. H., Mansur, D. B., Rubin, J. B. und Leonard, J. R. (2010), 'Postoperative imaging surveillance in pediatric pilocytic astrocytomas', *Journal of Neurosurgery: Pediatrics* **6**(4), 346–352.
- Dössinger, G., Bunse, M., Bet, J., Albrecht, J., Paszkiewicz, P. J., Weißbrich, B., Schiedewitz, I., Henkel, L., Schiemann, M., Neuenhahn, M., Uckert, W. und Busch, D. H. (2013), 'MHC Multimer-Guided and Cell Culture-Independent Isolation of Functional T Cell Receptors from Single Cells Facilitates TCR Identification for Immunotherapy', *PLoS ONE* **8**(4), e61384.
- Drake, D. R., Ream, R. M., Lawrence, C. W. und Braciale, T. J. (2005), 'Transient Loss of MHC Class I Tetramer Binding after CD8+ T Cell Activation Reflects Altered T Cell Effector Function', *Journal of Immunology* **175**(3), 1507–1515.
- Du, H. Q., Du, H. Q., Chen, L., Chen, L., Wang, Y., Wang, Y., Wang, L. J., Wang, L. J., Yan, H., Yan, H., Liu, H. Y., Liu, H. Y., Xiao, H. und Xiao, H. (2015), 'Increasing radiosensitivity with the downregulation of cofilin-1 in U251 human glioma cells', *Molecular Medicine Reports* **11**(5), 3354–3360.
- Du, M. X., Sim, J., Fang, L., Yin, Z., Koh, S., Stratton, J., Pons, J., Wang, J. J.-X. und Carte, B. (2004), 'Identification of Novel Small-Molecule Inhibitors for Human Transketolase by High-Throughput Screening with Fluorescent Intensity (FLINT) Assay', *Journal of Biomolecular Screening* **9**(5), 427–433.
- Dubois, L. G., Campanati, L., Righy, C., D'Andrea-Meira, I., Spohr, T. C. L. d. S. e., Porto-Carreiro, I., Pereira, C. M., Balça-Silva, J., Kahn, S. A., DosSantos, M. F., Oliveira, M. d. A. R., Ximenes-da Silva, A., Lopes, M. C., Faveret, E., Gasparetto, E. L. und Moura-Neto, V. (2014), 'Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier', *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8**, 629.
- Duncan, C. G., Barwick, B. G., Jin, G., Rago, C., Kapoor-Vazirani, P., Powell, D. R., Chi, J. T., Bigner, D. D., Vertino, P. M. und Yan, H. (2012), 'A heterozygous IDH1R132H/WT mutation induces genome-wide alterations in DNA methylation', *Genome research* **22**(12), 2339–2355.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. und Schreiber, R. D. (2002), 'Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape', *Nature immunology* **3**(11), 991–998.

- Dunn, G. P., Dunn, I. F. und Curry, W. T. (2007), 'Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma.', *Cancer immunity* **7**, 12.
- Dunn, G. P., Old, L. J. und Schreiber, R. D. (2004), 'The Three Es of Cancer Immunoediting', **22**(1), 329–360.
- Duraiswamy, J., Kaluza, K. M., Freeman, G. J. und Coukos, G. (2013), 'Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors.', *Cancer research* **73**(12), 3591–3603.
- Dutoit, V., Herold-Mende, C., Hilf, N., Schoor, O., Beckhove, P., Bucher, J., Dorsch, K., Flohr, S., Fritsche, J., Lewandrowski, P., Lohr, J., Rammensee, H.-G., Stevanovic, S., Trautwein, C., Vass, V., Walter, S., Walker, P. R., Weinschenk, T., Singh-Jasuja, H. und Dietrich, P.-Y. (2012), 'Exploiting the glioblastoma peptidome to discover novel tumour-associated antigens for immunotherapy', *brain.oxfordjournals.org* **135**(4), 1042–1054.
- Dutta, R. und Trapp, B. D. (2011), 'Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis', *Progress in Neurobiology* **93**(1), 1–12.
- Eckel-Passow, J. E., Lachance, D. H., Molinaro, A. M., Walsh, K. M., Decker, P. A., Sicotte, H., Pekmezci, M., Rice, T., Kosel, M. L., Smirnov, I. V., Sarkar, G., Caron, A. A., Kollmeyer, T. M., Praska, C. E., Chada, A. R., Halder, C., Hansen, H. M., McCoy, L. S., Bracci, P. M., Marshall, R., Zheng, S., Reis, G. F., Pico, A. R., O'Neill, B. P., Buckner, J. C., Giannini, C., Huse, J. T., Perry, A., Tihan, T., Berger, M. S., Chang, S. M., Prados, M. D., Wiemels, J., Wiencke, J. K., Wrensch, M. R. und Jenkins, R. B. (2015), 'Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors', *New England Journal of Medicine* **372**(26), 2499–2508.
- Eckerich, C., Zapf, S., Ulbricht, U., Müller, S., Fillbrandt, R., Westphal, M. und Lamszus, K. (2006), 'Contactin is expressed in human astrocytic gliomas and mediates repulsive effects', *Glia* **53**(1), 1–12.
- Eckhardt, F., Lewin, J., Cortese, R., Rakyan, V. K., Attwood, J., Burger, M., Burton, J., Cox, T. V., Davies, R., Down, T. A., Haefliger, C., Horton, R., Howe, K., Jackson, D. K., Kunde, J., Koenig, C., Liddle, J., Niblett, D., Otto, T., Pettett, R., Seemann, S., Thompson, C., West, T., Rogers, J., Olek, A., Berlin, K. und Beck, S. (2006), 'DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22.', *Nature Genetics* **38**(12), 1378–1385.
- Egginton, S., Hudlicka, O., Brown, M. D., Graciotti, L. und Granata, A. L. (1996), 'In vivo pericyte-endothelial cell interaction during angiogenesis in adult cardiac and skeletal muscle.', *Microvascular research* **51**(2), 213–228.
- Egwuagu, C. E. (2009), 'STAT3 in CD4+ T helper cell differentiation and inflammatory diseases.', *Cytokine* **47**(3), 149–156.

- Elias, P. (2007), 'The skin barrier as an innate immune element', *Seminars in Immunopathology* **29**(1), 3–14.
- Ene, C. I. und Holland, E. C. (2015), 'Personalized medicine for gliomas.', *Surgical neurology international* **6**(Suppl 1), S89–95.
- Fadul, C. E., Fisher, J. L., Hampton, T. H., Lallana, E. C., Li, Z., Gui, J., Szczepiorkowski, Z. M., Tosteson, T. D., Rhodes, C. H., Wishart, H. A., Lewis, L. D. und Ernstoff, M. S. (2011), 'Immune response in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with intranodal autologous tumor lysate-dendritic cell vaccination after radiation chemotherapy.', *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* **34**(4), 382–389.
- Falk, J., Bonnon, C., Girault, J.-A. und Faivre-Sarrailh, C. (2002), 'F3/contactin, a neuronal cell adhesion molecule implicated in axogenesis and myelination.', *Biology of the Cell* **94**(6), 327–334.
- Falk, K., Röttschke, O., Stevanović, S., Jung, G. und Rammensee, H.-G. (1991), 'Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules', *Nature* **351**(6324), 290–296.
- Fang, L., Lowther, D. E., Meizlish, M. L., Anderson, R. C. E., Bruce, J. N., Devine, L., Huttner, A. J., Kleinstein, S. H., Lee, J. Y., Stern, J. N. H., Yaari, G., Lovato, L., Cronk, K. M. und O'Connor, K. C. (2013), 'The immune cell infiltrate populating meningiomas is composed of mature, antigen-experienced T and B cells. - PubMed - NCBI', *Neuro-Oncology* **15**(11), 1479–1490.
- Feller, S. M. (2001), 'Crk family adaptors-signalling complex formation and biological roles.', *Oncogene* **20**(44), 6348–6371.
- Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Ježek, Z. und Ladnyi, I. (1987), 'Smallpox and its eradication', *Geneva: WHO*.
- Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H.-P. und Novotny, W. (2004), 'Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer.', *Nature reviews. Drug discovery* **3**(5), 391–400.
- Fiore, G., Cristo, C. D., Monti, G., Amoresano, A., Columbano, L., Pucci, P., Cioffi, F. A., Cosmo, A. D., Palumbo, A. und d'Ischia, M. (2006), 'Tubulin nitration in human gliomas', *Neuroscience Letters* **394**(1), 57–62.
- Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N. und Mills, K. H. G. (2010), 'T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis', *Clinical & Experimental Immunology* **162**(1), 1–11.
- Flügel, A., Schwaiger, F. W., Neumann, H., Medana, I., Willem, M., Wekerle, H., Kreutzberg, G. W. und Graeber, M. B. (2000), 'Neuronal FasL induces cell death of encephalitogenic T lymphocytes.', *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* **10**(3), 353–364.

- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. und Rudensky, A. Y. (2003), 'Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells.', *Nature immunology* **4**(4), 330–336.
- Fournier, H.-N., Albigès-Rizo, C. und Block, M. R. (2003), 'New Insights into Nm23 Control of Cell Adhesion and Migration', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **35**(1), 81–87.
- Frahm, N., Yusim, K., Suscovich, T. J., Adams, S., Sidney, J., Hraber, P., Hewitt, H. S., Linde, C. H., Kavanagh, D. G., Woodberry, T., Henry, L. M., Faircloth, K., Listgarten, J., Kadie, C., Jojic, N., Sango, K., Brown, N. V., Pae, E., Zaman, M. T., Bihl, F., Khatri, A., John, M., Mallal, S., Marincola, F. M., Walker, B. D., Sette, A., Heckerman, D., Korber, B. T. und Brander, C. (2007), 'Extensive HLA class I allele promiscuity among viral CTL epitopes', *European journal of immunology* **37**(9), 2419–2433.
- Fujita, N., Saito, R., Watanabe, K. und Nagata, S. (2000), 'An essential role of the neuronal cell adhesion molecule contactin in development of the *Xenopus* primary sensory system.', *Developmental biology* **221**(2), 308–320.
- Galea, I., Palin, K., Newman, T. A., van Rooijen, N., Perry, V. H. und Boche, D. (2005), 'Mannose receptor expression specifically reveals perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain.', *Glia* **49**(3), 375–384.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., DiMeco, F. und Vescovi, A. (2004), 'Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma.', *Cancer research* **64**(19), 7011–7021.
- Galluzzi, L., Vacchelli, E., Bravo-San Pedro, J.-M., Buqué, A., Senovilla, L., Baracco, E. E., Bloy, N., Castoldi, F., Abastado, J.-P., Agostinis, P., Apte, R. N., Aranda, F., Ayyoub, M., Beckhove, P., Blay, J.-Y., Bracci, L., Caignard, A., Castelli, C., Cavallo, F., Celis, E., Cerundolo, V., Clayton, A., Colombo, M. P., Coussens, L., Dhodapkar, M. V., Eggermont, A. M., Fearon, D. T., Fridman, W. H., Fučíková, J., Gabilovich, D. I., Galon, J., Garg, A., Ghiringhelli, F., Giaccone, G., Gilboa, E., Gnjatic, S., Hoos, A., Hosmalin, A., Jäger, D., Kalinski, P., Kärre, K., Kepp, O., Kiessling, R., Kirkwood, J. M., Klein, E., Knuth, A., Lewis, C. E., Liblau, R., Lotze, M. T., Lugli, E., Mach, J.-P., Mattei, F., Mavilio, D., Melero, I., Melief, C. J., Mittendorf, E. A., Moretta, L., Odunsi, A., Okada, H., Palucka, A. K., Peter, M. E., Pienta, K. J., Porgador, A., Prendergast, G. C., Rabinovich, G. A., Restifo, N. P., Rizvi, N., Sautès-Fridman, C., Schreiber, H., Seliger, B., Shiku, H., Silva-Santos, B., Smyth, M. J., Speiser, D. E., Spisek, R., Srivastava, P. K., Talmadge, J. E., Tartour, E., Van Der Burg, S. H., Van den Eynde, B. J., Vile, R., Wagner, H., Weber, J. S., Whiteside, T. L., Wolchok, J. D., Zitvogel, L., Zou, W. und Kroemer, G. (2014), 'Classification of current anticancer immunotherapies.', *Oncotarget* **5**(24), 12472–12508.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindhoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P.-H., Trajanoski, Z., Frid-

- man, W.-H. und Pagès, F. (2006), 'Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome.', *Science* **313**(5795), 1960–1964.
- Garcia, K. C., Teyton, L. und Wilson, I. A. (1999), 'STRUCTURAL BASIS OF T CELL RECOGNITION', **17**(1), 369–397.
- Gatenby, R. A. und Gillies, R. J. (2004), 'Why do cancers have high aerobic glycolysis', *Nature Reviews Cancer* **4**(11), 891–899.
- Geisenberger, C., Mock, A., Warta, R., Rapp, C., Schwager, C., Korshunov, A., Nied, A.-K., Capper, D., Brors, B., Jungk, C., Jones, D., Collins, V. P., Ichimura, K., Bäcklund, L. M., Schnabel, E., Mittelbron, M., Lahrmann, B., Zheng, S., Verhaak, R. G. W., Grabe, N., Pfister, S. M., Hartmann, C., von Deimling, A., Debus, J., Unterberg, A., Abdollahi, A. und Herold-Mende, C. (2015), 'Molecular profiling of long-term survivors identifies a subgroup of glioblastoma characterized by chromosome 19/20 co-gain.', *Acta neuropathologica* **130**(3), 419–434.
- Gerlach, C., van Heijst, J. W. J., Swart, E., Sie, D., Armstrong, N., Kerkhoven, R. M., Zehn, D., Bevan, M. J., Schepers, K. und Schumacher, T. N. M. (2010), 'One naive T cell, multiple fates in CD8 +T cell differentiation', *The Journal of experimental medicine* **207**(6), 1235–1246.
- Germann, A., Oh, Y.-J., Schmidt, T., Schön, U., Zimmermann, H. und von Briesen, H. (2013), 'Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function', *Cryobiology* **67**(2), 193–200.
- Giachino, C., Boulay, J.-L., Ivanek, R., Alvarado, A., Tostado, C., Lugert, S., Tchorz, J., Coban, M., Mariani, L., Bettler, B., Lathia, J., Frank, S., Pfister, S., Kool, M. und Taylor, V. (2015), 'A Tumor Suppressor Function for Notch Signaling in Forebrain Tumor Subtypes', *Cancer Cell* **28**(6), 730–742.
- Giannini, C., Burger, P. C., Berkey, B. A., Cairncross, J. G., Jenkins, R. B., Mehta, M., Curran, W. J. und Aldape, K. (2008), 'Anaplastic Oligodendroglial Tumors: Refining the Correlation among Histopathology, 1p 19q Deletion and Clinical Outcome in Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402', *Brain Pathology* **18**(3), 360–369.
- Gilbert, M. R., Wang, M., Aldape, K., Lassman, A., Sorensen, A. G., Mikkelsen, T., Groves, M., Werner-Wasik, M., Regine, W. und Mehta, M. (2009), 'RTOG 0625: A phase II study of bevacizumab with irinotecan in recurrent glioblastoma (GBM)', *Journal of Clinical Oncology* **27**(15).
- Goldmann, J., Kwidzinski, E., Brandt, C., Mahlo, J., Richter, D. und Bechmann, I. (2006), 'T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa.', *Journal of leukocyte biology* **80**(4), 797–801.

- Gonzalez-Galarza, F. F., Christmas, S., Middleton, D. und Jones, A. R. (2011), 'Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations.', *Nucleic Acids Research* **39**(Database issue), D913–9.
- Gonzalez-Galarza, F. F., Takeshita, L. Y. C., Santos, E. J. M., Kempson, F., Maia, M. H. T., da Silva, A. L. S., Teles e Silva, A. L., Ghattaoraya, G. S., Alfirevic, A., Jones, A. R. und Middleton, D. (2015), 'Allele frequency net 2015 update: new features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations.', *Nucleic Acids Research* **43**(Database issue), D784–8.
- Gordon, S. (2002), 'Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response.', *Cell* **111**(7), 927–930.
- Goverman, J. (2009), 'Autoimmune T cell responses in the central nervous system', *Nature reviews. Immunology* **9**(6), 393–407.
- Gregory, M. S., Koh, S., Huang, E., Saff, R. R., Marshak-Rothstein, A., Mukai, S. und Ksander, B. R. (2005), 'A Novel Treatment for Ocular Tumors Using Membrane FasL Vesicles to Activate Innate Immunity and Terminate Immune Privilege', *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **46**(7), 2495–2502.
- Grier, J. T. und Batchelor, T. (2006), 'Low-grade gliomas in adults.', *The oncologist* **11**(6), 681–693.
- Grossman, S. A., Ye, X., Lesser, G., Sloan, A., Carraway, H., Desideri, S., Piantadosi, S. und NABTT CNS Consortium (2011), 'Immunosuppression in patients with high-grade gliomas treated with radiation and temozolomide.', *Clinical cancer research* **17**(16), 5473–5480.
- Grujic, M., Bartholdy, C. und Remy, M. (2010), 'The role of CD80/CD86 in generation and maintenance of functional virus-specific CD8+ T cells in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus', *The Journal of Immunology* **185**(1), 1730–1743.
- Guo, C., Pirozzi, C. J., Lopez, G. Y. und Yan, H. (2011), 'Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas', *Current Opinion in Neurology* **24**(6), 648–652.
- Guruharsha, K. G., Kankel, M. W. und Artavanis-Tsakonas, S. (2012), 'The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway', *Nature Reviews Genetics* **13**(9), 654–666.
- Hamilton, N. B., Attwell, D. und Hall, C. N. (2010), 'Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease.', *Frontiers in neuroenergetics* **2**.
- Han, A., Glanville, J., Hansmann, L. und Davis, M. M. (2014), 'Linking T-cell receptor sequence to functional phenotype at the single-cell level.', *Nature Publishing Group* **32**(7), 684–692.

- Han, S. (2014), 'Tumour-infiltrating CD4(+) and CD8(+) lymphocytes as predictors of clinical outcome in glioma.', *British Journal of Cancer* **110**(10), 2560–2568.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2011), 'Hallmarks of cancer: the next generation.', *Cell* **144**(5), 646–674.
- Hardesty, D. A. und Sanai, N. (2012), 'The value of glioma extent of resection in the modern neurosurgical era.', *Frontiers in neurology* **3**, 140.
- Hartmann, C., Meyer, J., Balss, J., Capper, D., Mueller, W., Christians, A., Felsberg, J., Wolter, M., Mawrin, C., Wick, W., Weller, M., Herold-Mende, C., Unterberg, A., Jeuken, J. W. M., Wesseling, P., Reifenberger, G. und Deimling, A. (2009), 'Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas', *Acta neuropathologica* **118**(4), 469–474.
- Hartmann, C. und von Deimling, A. (2009), 'Molecular pathology of oligodendroglial tumors.', *Recent results in cancer research* **171**(Chapter 2), 25–49.
- Hartmann, C., Zozulya, A., Wegener, J. und Galla, H.-J. (2007), 'The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells: an in vitro study.', *Experimental Cell Research* **313**(7), 1318–1325.
- Hartsough, M. T. und Steeg, P. S. (2000), 'Nm23/nucleoside diphosphate kinase in human cancers.', *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **32**(3), 301–308.
- Hartz, A. M. S., Bauer, B., Fricker, G. und Miller, D. S. (2004), 'Rapid regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier by endothelin-1.', *Molecular pharmacology* **66**(3), 387–394.
- Hatano, M., Eguchi, J., Tatsumi, T., Kuwashima, N., Dusak, J. E., Kinch, M. S., Pollack, I. F., Hamilton, R. L., Storkus, W. J. und Okada, H. (2005), 'EphA2 as a glioma-associated antigen: a novel target for glioma vaccines.', *Neoplasia (New York, N.Y.)* **7**(8), 717–722.
- Hawkins, B. T. und Davis, T. P. (2005), 'The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease.', *Pharmacological reviews* **57**(2), 173–185.
- Hegde, M., Corder, A., Chow, K. K., Mukherjee, M., Ashoori, A., Kew, Y., Zhang, Y. J., Baskin, D. S., Merchant, F. A., Brawley, V. S., Byrd, T. T., Krebs, S., Wu, M.-F., Liu, H., Heslop, H. E., Gottschalk, S., Yvon, E. und Ahmed, N. (2013), 'Combinational Targeting Offsets Antigen Escape and Enhances Effector Functions of Adoptively Transferred T Cells in Glioblastoma', *Molecular Therapy* **21**(11), 2087–2101.
- Heimberger, A. B. (2008a), 'Immunological responses in a patient with glioblastoma multiforme treated with sequential courses of temozolomide and immunotherapy: case study.', *Neuro-Oncology* **10**(1), 98–103.

- Heimberger, A. B. (2008b), 'Incidence and prognostic impact of FoxP3+ regulatory T cells in human gliomas.', *Clinical cancer research* **14**(16), 5166–5172.
- Heimberger, A. B., Crotty, L. E., Archer, G. E., Hess, K. R., Wikstrand, C. J., Friedman, A. H., Friedman, H. S., Bigner, D. D. und Sampson, J. H. (2003), 'Epidermal growth factor receptor VIII peptide vaccination is efficacious against established intracerebral tumors.', *Clinical cancer research* **9**(11), 4247–4254.
- Herold-Mende, C., Mueller, M. M., Bonsanto, M. M., Schmitt, H. P., Kunze, S. und Steiner, H.-H. (2002), 'Clinical impact and functional aspects of tenascin-C expression during glioma progression.', *International journal of cancer. Journal international du cancer* **98**(3), 362–369.
- Hickey, W. F., Hsu, B. L. und Kimura, H. (1991), 'T-lymphocyte entry into the central nervous system', *Journal of neuroscience research* **28**(2), 254–260.
- Hinojosa, A. E., Garcia-Bueno, B., Leza, J. C. und Madrigal, J. L. M. (2011), 'CCL2/MCP-1 modulation of microglial activation and proliferation.', *Journal of Neuroinflammation* **8**(1), 77.
- Hodge, K., Have, S. T., Hutton, L. und Lamond, A. I. (2013), 'Cleaning up the masses: Exclusion lists to reduce contamination with HPLC-MS/MS', *Journal of Proteomics* **88**, 92–103.
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J. M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A. und Urba, W. J. (2010), 'Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.', *New England Journal of Medicine* **363**(8), 711–723.
- Hörtl, L., Ramoner, R., Zelle-Rieser, C., Gander, H., Putz, T., Papesh, C., Nussbaumer, W., Falkensammer, C., Bartsch, G. und Thurnher, M. (2004), 'Allogeneic dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma with or without cyclophosphamide', *Cancer Immunology, Immunotherapy* **54**(7), 663–670.
- Hoof, I., Peters, B., Sidney, J., Pedersen, L. E. und Sette, A. (2009), 'NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans', *Immunogenetics* **61**, 1.
- Hori, S., Nomura, T. und Sakaguchi, S. (2003), 'Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.', *Science* **299**(5609), 1057–1061.
- Hotulainen, P. und Hoogenraad, C. C. (2010), 'Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function', *The Journal of Cell Biology* **189**(4), 619–629.

- Hsia, J.-Y., Chen, J.-T., Chen, C.-Y., Hsu, C.-P., Miaw, J., Huang, Y.-S. und Yang, C.-Y. (2005), 'Prognostic significance of intratumoral natural killer cells in primary resected esophageal squamous cell carcinoma.', *Chang Gung medical journal* **28**(5), 335–340.
- Hsu, M. S., Sedighim, S., Wang, T., Antonios, J. P., Everson, R. G., Tucker, A. M., Du, L., Emerson, R., Yusko, E., Sanders, C., Robins, H. S., Yong, W. H., Davidson, T. B., Li, G., Liao, L. M. und Prins, R. M. (2016), 'TCR Sequencing Can Identify and Track Glioma-Infiltrating T Cells after DC Vaccination.', *Cancer Immunology Research* **4**(5), 412–418.
- Huettner, C., Czub, S., Kerkau, S., Roggendorf, W. und Tonn, J. C. (1997), 'Interleukin 10 is expressed in human gliomas in vivo and increases glioma cell proliferation and motility in vitro.', *Anticancer Research* **17**(5A), 3217–3224.
- Humphrey, P. A., Wong, A. J., Vogelstein, B., Zalutsky, M. R., Fuller, G. N., Archer, G. E., Friedman, H. S., Kwatra, M. M., Bigner, S. H. und Bigner, D. D. (1990), 'Anti-synthetic peptide antibody reacting at the fusion junction of deletion-mutant epidermal growth factor receptors in human glioblastoma.', *PNAS* **87**(11), 4207–4211.
- Hung, S.-I., Chang, A. C., Kato, I. und Chang, N.-C. A. (2002), 'Transient expression of Ym1, a heparin-binding lectin, during developmental hematopoiesis and inflammation.', *Journal of leukocyte biology* **72**(1), 72–82.
- Huppa, J. B. und Davis, M. M. (2003), 'T-cell-antigen recognition and the immunological synapse', *Nature reviews. Immunology* **3**(12), 973–983.
- Hussain, S. F., Yang, D., Suki, D., Aldape, K., Grimm, E. und Heimberger, A. B. (2006), 'The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating antitumor immune responses.', *Neuro-Oncology* **8**(3), 261–279.
- Hwang, W.-T., Adams, S. F., Tahirovic, E., Hagemann, I. S. und Coukos, G. (2012), 'Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis.', *Gynecologic oncology* **124**(2), 192–198.
- Iadecola, C. und Nedergaard, M. (2007), 'Glial regulation of the cerebral microvasculature.', *Nature Neuroscience* **10**(11), 1369–1376.
- Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S. und Aikou, T. (2000), 'Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma.', *Cancer* **88**(3), 577–583.

- Iwadate, Y., Sakaida, T., Hiwasa, T., Nagai, Y., Ishikura, H., Takiguchi, M. und Yamaura, A. (2004), 'Molecular classification and survival prediction in human gliomas based on proteome analysis.', *Cancer research* **64**(7), 2496–2501.
- Iwahara, T., Akagi, T., Shishido, T. und Hanafusa, H. (2003), 'CrkII induces serum response factor activation and cellular transformation through its function in Rho activation', *Oncogene* **22**(38), 5946–5957.
- Jackson, C., Ruzevick, J., Phallen, J., Belcaid, Z. und Lim, M. (2011), 'Challenges in immunotherapy presented by the glioblastoma multiforme microenvironment.', *Clinical and Developmental Immunology* **2011**, 732413.
- Jacobs, J. F. M., Idema, A. J., Bol, K. F., Nierkens, S., Grauer, O. M., Wesseling, P., Grotenhuis, J. A., Hoogerbrugge, P. M., de Vries, I. J. M. und Adema, G. J. (2009), 'Regulatory T cells and the PD-L1/PD-1 pathway mediate immune suppression in malignant human brain tumors.', *Neuro-Oncology* **11**(4), 394–402.
- Jakola, A. S., Myrnel, K. S., Kloster, R., Torp, S. H., Lindal, S., Unsgård, G. und Solheim, O. (2012), 'Comparison of a Strategy Favoring Early Surgical Resection vs a Strategy Favoring Watchful Waiting in Low-Grade Gliomas', *JAMA* **308**(18), 1881.
- Jarnicki, A. G., Lysaght, J., Todryk, S. und Mills, K. H. G. (2006), 'Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells.', *Journal of Immunology* **177**(2), 896–904.
- Jiang, Y., Li, Y. und Zhu, B. (2015), 'T-cell exhaustion in the tumor microenvironment', *Cell Death and Disease* **6**(6), e1792.
- Jones, P. A. und Baylin, S. B. (2007), 'The Epigenomics of Cancer', *Cell* **128**(4), 683–692.
- Jung, D. und Alt, F. W. (2004), 'Unraveling V(D)J Recombination', *Cell* **116**(2), 299–311.
- Jung, S., PAEK, Y.-W., MOON, K.-S., WEE, S.-C., RYU, H.-H., JEONG, Y.-I., SUN, H.-S., JIN, Y.-H., KIM, K.-K. und AHN, K.-Y. (2006), 'Expression of Nm23 in gliomas and its effect on migration and invasion in vitro.', *Anticancer Research* **26**(1A), 249–258.
- Jungk, C., Scherer, M., Mock, A., Capper, D., Radbruch, A., von Deimling, A., Bendszus, M., Herold-Mende, C. und Unterberg, A. (2016), 'Prognostic value of the extent of resection in supratentorial WHO grade II astrocytomas stratified for IDH1 mutation status: a single-center volumetric analysis.', *Journal of Neuro-Oncology* **129**(2), 319–328.
- Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszczy, M., Blaser, K. und Akdis, C. A. (2003), 'IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy.', *European journal of immunology* **33**(5), 1205–1214.

- Kageyama, S., Tsomides, T. J., Fukusen, N., Papayannopoulos, I. A., Eisen, H. N. und Sykulev, Y. (2001), 'Potent Cytolytic Response by a CD8+ CTL Clone to Multiple Peptides from the Same Protein in Association with an Allogeneic Class I MHC Molecule', *Journal of Immunology* **166**(5), 3028–3034.
- Kalinina, J., Peng, J., Ritchie, J. C. und Van Meir, E. G. (2011), 'Proteomics of gliomas: initial biomarker discovery and evolution of technology.', *Neuro-Oncology* **13**(9), 926–942.
- Kantor, J. D., McCormick, B., Steeg, P. S. und Zetter, B. R. (1993), 'Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells.', *Cancer research* **53**(9), 1971–1973.
- Kathagen, A., Schulte, A., Balcke, G., Phillips, H. S., Martens, T., Matschke, J., Günther, H. S., Soriano, R., Modrusan, Z., Sandmann, T., Kuhl, C., Tissier, A., Holz, M., Krawinkel, L. A., Glatzel, M., Westphal, M. und Lamszus, K. (2013), 'Hypoxia and oxygenation induce a metabolic switch between pentose phosphate pathway and glycolysis in glioma stem-like cells', *Acta neuropathologica* **126**(5), 763–780.
- Keezer, S. M., Ivie, S. E., Krutzsch, H. C., Tandle, A., Libutti, S. K. und Roberts, D. D. (2003), 'Angiogenesis inhibitors target the endothelial cell cytoskeleton through altered regulation of heat shock protein 27 and cofilin.', *Cancer research* **63**(19), 6405–6412.
- Keller, B. O., Sui, J., Young, A. B. und Whittal, R. M. (2008), 'Interferences and contaminants encountered in modern mass spectrometry.', *Analytica chimica acta* **627**(1), 71–81.
- Khalil, A. A. und James, P. (2007), 'Biomarker discovery: a proteomic approach for brain cancer profiling.', *Cancer Science* **98**(2), 201–213.
- Killela, P. J., Pirozzi, C. J., Healy, P., Reitman, Z. J., Lipp, E., Rasheed, B. A., Yang, R., Diplas, B. H., Wang, Z., Greer, P. K., Zhu, H., Wang, C. Y., Carpenter, A. B., Friedman, H., Friedman, A. H., Keir, S. T., He, J., He, Y., McLendon, R. E., Herndon, J. E., Yan, H. und Bigner, D. D. (2014), 'Mutations in IDH1, IDH2, and in the TERT promoter define clinically distinct subgroups of adult malignant gliomas.', *Oncotarget* **5**(6), 1515–1525.
- Kim, Y.-H., Jung, T.-Y., Jung, S., Jang, W.-Y., MOON, K.-S., Kim, I.-Y., Lee, M.-C. und Lee, J.-J. (2012), 'Tumour-infiltrating T-cell subpopulations in glioblastomas.', *British Journal of Neurosurgery* **26**(1), 21–27.
- Kimura, H., Sakai, K., Arao, T., Shimoyama, T., Tamura, T. und Nishio, K. (2007), 'Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor.', *Cancer Science* **98**(8), 1275–1280.
- Kiniwa, Y., Miyahara, Y., Wang, H. Y., Peng, W., Peng, G., Wheeler, T. M., Thompson, T. C., Old, L. J. und Wang, R.-F. (2007), 'CD8+ Foxp3+ regulatory T cells mediate immunosuppression in prostate cancer.', *Clinical cancer research* **13**(23), 6947–6958.

- Kirsch, I., Vignali, M. und Robins, H. (2015), 'T-cell receptor profiling in cancer', *Molecular Oncology* **9**(10), 2063–2070.
- Kleihues, P. und Louis, D. N. (2002), 'The WHO classification of tumors of the nervous system', *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **61**(3), 215–225.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M. und Hogquist, K. A. (2014), 'Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see)', *Nature reviews. Immunology* **14**(6), 377–391.
- Klug, F., Prakash, H., Huber, P. E., Seibel, T., Bender, N., Halama, N., Pfirschke, C., Voss, R. H., Timke, C., Umansky, L., Klapproth, K., Schäkel, K., Garbi, N., Jäger, D., Weitz, J., Schmitz-Winnenthal, H., Hämmerling, G. J. und Beckhove, P. (2013), 'Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy.', *Cancer Cell* **24**(5), 589–602.
- Kmieciak, J., Poli, A., Brons, N. H. C., Waha, A., Eide, G. E., Enger, P. Ø., Zimmer, J. und Chekenya, M. (2013), 'Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level', *Journal of Neuroimmunology* **264**(1-2), 71–83.
- Koch, T., Brugger, T., Bach, A., Gennarini, G. und Trotter, J. (1997), 'Expression of the immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule F3 by oligodendrocyte-lineage cells.', *Glia* **19**(3), 199–212.
- Komohara, Y., Ohnishi, K., Kuratsu, J. und Takeya, M. (2008), 'Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas.', *The Journal of Pathology* **216**(1), 15–24.
- Kondethimmanahalli Chandramouli, P.-Y. Q. (2009), 'Proteomics: Challenges, Techniques and Possibilities to Overcome Biological Sample Complexity', *Human Genomics and Proteomics : HGP* **2009**(1), 1–22.
- Kondo, E., Koda, K., Takiguchi, N., Oda, K., Seike, K., Ishizuka, M. und Miyazaki, M. (2003), 'Preoperative Natural Killer Cell Activity as a Prognostic Factor for Distant Metastasis following Surgery for Colon Cancer', *Digestive Surgery* **20**(5), 445–451.
- Kowal, K., Silver, R., Sławińska, E., Bielecki, M., Chyczewski, L. und Kowal-Bielecka, O. (2011), 'CD163 and its role in inflammation.', *Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society* **49**(3), 365–374.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S. L., Haseloff, R. F., Piontek, J. und Blasig, I. E. (2008), 'Structure and function of claudins. - PubMed - NCBI', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1778**(3), 631–645.

- Laird, P. W. (2003), 'The power and the promise of DNA methylation markers.', *Nature Reviews Cancer* **3**(4), 253–266.
- Lata, S., Bhasin, M. und Raghava, G. P. S. (2009), 'MHCBN 4.0: A database of MHC/TAP binding peptides and T-cell epitopes.', *BMC research notes* **2**, 61.
- Lawrence, M. S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G. V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S. L., Stewart, C., Mermel, C. H., Roberts, S. A., Kiezun, A., Hammerman, P. S., McKenna, A., Drier, Y., Zou, L., Ramos, A. H., Pugh, T. J., Stransky, N., Helman, E., Kim, J., Sougnez, C., Ambrogio, L., Nickerson, E., Shefler, E., Cortés, M. L., Auclair, D., Saksena, G., Voet, D., Noble, M., DiCara, D., Lin, P., Lichtenstein, L., Heiman, D. I., Fennell, T., Imielinski, M., Hernandez, B., Hodis, E., Baca, S., Dulak, A. M., Lohr, J., Landau, D.-A., Wu, C. J., Melendez-Zajgla, J., Hidalgo-Miranda, A., Koren, A., McCarroll, S. A., Mora, J., Lee, R. S., Crompton, B., Onofrio, R., Parkin, M., Winckler, W., Ardlie, K., Gabriel, S. B., Roberts, C. W. M., Biegel, J. A., Stegmaier, K., Bass, A. J., Garraway, L. A., Meyerson, M., Golub, T. R., Gordenin, D. A., Sunyaev, S., Lander, E. S. und Getz, G. (2013), 'Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes', *Nature* **499**(7457), 214–218.
- Le, D. T., Ladle, B. H., Lee, T., Weiss, V., Yao, X., Leubner, A., Armstrong, T. D. und Jaffee, E. M. (2011), 'CD8+Foxp3+ tumor infiltrating lymphocytes accumulate in the context of an effective anti-tumor response', *International journal of cancer. Journal international du cancer* **129**(3), 636–647.
- Le, D. T., Uram, J. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Kemberling, H., Eyring, A. D., Skora, A. D., Luber, B. S., Azad, N. S., Laheru, D., Biedrzycki, B., Donehower, R. C., Zaheer, A., Fisher, G. A., Crocenzi, T. S., Lee, J. J., Duffy, S. M., Goldberg, R. M., de la Chapelle, A., Koshiji, M., Bhajee, F., Huebner, T., Hruban, R. H., Wood, L. D., Cuka, N., Pardoll, D. M., Papadopoulos, N., Kinzler, K. W., Zhou, S., Cornish, T. C., Taube, J. M., Anders, R. A., Eshleman, J. R., Vogelstein, B. und Diaz, L. A. (2015), 'PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency.', *New England Journal of Medicine* **372**(26), 2509–2520.
- Leidinger, P., Keller, A., Heisel, S., Ludwig, N., Rheinheimer, S., Klein, V., Andres, C., Hamacher, J., Huer, H., Stephan, B., Stehle, I., Lenhof, H.-P. und Meese, E. (2009), 'Novel autoantigens immunogenic in COPD patients', *Respiratory Research* **10**(1), 20.
- Leuthardt, E. C., Duan, C., Kim, M. J., Campian, J. L., Kim, A. H., Miller-Thomas, M. M., Shimony, J. S. und Tran, D. D. (2016), 'Hyperthermic Laser Ablation of Recurrent Glioblastoma Leads to Temporary Disruption of the Peritumoral Blood Brain Barrier', *PLoS ONE* **11**(2), e0148613.
- Levings, M. K., Sangregorio, R., Galbiati, F., Squadrone, S., de Waal Malefyt, R. und Roncarolo, M. G. (2001), 'IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells.', *Journal of Immunology* **166**(9), 5530–5539.

- Liau, L. M., Lallone, R. L., Seitz, R. S., Buznikov, A. und Gregg, J. P. (2000), 'Identification of a human glioma-associated growth factor gene, granulin, using differential immuno-absorption', *Cancer research* **60**, 1353–1360.
- Lim, J. P. und Gleeson, P. A. (2011), 'Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps', *Immunology and Cell Biology* **89**(8), 836–843.
- Lin, S., Li, J., Wang, P., Zang, Y., Feng, F. und Zhao, T. B. (2016), 'Differential proteomics analysis of oligodendrogliomas and astrocytomas using iTRAQ quantification', *PeerJ Preprints* p. 2.
- Liu, C., Sage, J. C., Miller, M. R., Verhaak, R. G. W., Hippenmeyer, S., Vogel, H., Foreman, O., Bronson, R. T., Nishiyama, A., Luo, L. und Zong, H. (2011), 'Mosaic Analysis with Double Markers Reveals Tumor Cell of Origin in Glioma', *Cell* **146**(2), 209–221.
- Lohr, J., Ratliff, T., Huppertz, A., Ge, Y., Dictus, C., Ahmadi, R., Grau, S., Hiraoka, N., Eckstein, V., Ecker, R. C., Korff, T., von Deimling, A., Unterberg, A., Beckhove, P. und Herold-Mende, C. (2011), 'Effector T-Cell Infiltration Positively Impacts Survival of Glioblastoma Patients and Is Impaired by Tumor-Derived TGF- β ', *Clinical Cancer Research* **17**(13), 4296–4308.
- Lombardi, D., Lacombe, M. L. und Paggi, M. G. (2000), 'nm23: unraveling its biological function in cell differentiation.', *Journal of cellular physiology* **182**(2), 144–149.
- Longhi, M. S., Hussain, M. J., Mitry, R. R., Arora, S. K., Mieli-Vergani, G., Vergani, D. und Ma, Y. (2006), 'Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis.', *Journal of Immunology* **176**(7), 4484–4491.
- Lou, Y., Shi, J., Guo, D., Qureshi, A. K. und Song, L. (2015), 'Function of PD-L1 in antitumor immunity of glioma cells', *Saudi Journal of Biological Science* .
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvet, A., Scheithauer, B. W. und Kleihues, P. (2007), 'The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System', *Acta neuropathologica* **114**(2), 97–109.
- Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P. und Ellison, D. W. (2016), 'The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary', *Acta neuropathologica* **131**(6), 803–820.
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., Derecki, N. C., Castle, D., Mandell, J. W., Lee, K. S., Harris, T. H. und Kipnis, J. (2015), 'Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels.', *Nature* **523**(7560), 337–341.

- Lu, C., Venneti, S., Akalin, A., Fang, F., Ward, P. S., DeMatteo, R. G., Intlekofer, A. M., Chen, C., Ye, J., Hameed, M., Nafa, K., Agaram, N. P., Cross, J. R., Khanin, R., Mason, C. E., Healey, J. H., Lowe, S. W., Schwartz, G. K., Melnick, A. und Thompson, C. B. (2013), 'Induction of sarcomas by mutant IDH2', *Genes & Development* **27**(18), 1986–1998.
- Madden, D. R. (1995), 'The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes', *Annual Review of Immunology* **13**(1), 587–622.
- Magnus, T., Schreiner, B., Korn, T., Jack, C., Guo, H., Antel, J., Ifergan, I., Chen, L., Bischof, F., Bar-Or, A. und Wiendl, H. (2005), 'Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: implications for immune responses and autoimmunity in the CNS.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**(10), 2537–2546.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. und Sica, A. (2002), 'Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes', *Trends in immunology* **23**(11), 549–555.
- Martin, K., King, A., O'Neill, K., Kandaneeratchi, A., Liyanage, K. und Pilkington, G. J. (1998), 'Expression of the candidate invasion suppressor gene, nm23, in human brain tumors', *Neuropathology* **18**(3), 315–320.
- Masopust, D. und Schenkel, J. M. (2013), 'The integration of T cell migration, differentiation and function.', *Nature reviews. Immunology* .
- Masson, F., Calzascia, T., Di Bernardino-Besson, W., de Tribolet, N., Dietrich, P.-Y. und Walker, P. R. (2007), 'Brain microenvironment promotes the final functional maturation of tumor-specific effector CD8+ T cells.', *Journal of Immunology* **179**(2), 845–853.
- Masters, J. R., Thomson, J. A., Daly-Burns, B., Reid, Y. A., Dirks, W. G., Packer, P., Toji, L. H., Ohno, T., Tanabe, H., Arlett, C. F., Kelland, L. R., Harrison, M., Virmani, A., Ward, T. H., Ayres, K. L. und Debenham, P. G. (2001), 'Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines', *PNAS* **98**(14), 8012–8017.
- Matsuda, M., Tanaka, S., Nagata, S., Kojima, A., Kurata, T. und Shibuya, M. (1992), 'Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities.', *Molecular and cellular biology* **12**(8), 3482–3489.
- Matsumura, M., Fremont, D. H., Peterson, P. A. und Wilson, I. A. (1992), 'Emerging principles for the recognition of peptide antigens by MHC class I molecules.', *Science* **257**(5072), 927–934.
- Mayer, B. J., Hamaguchi, M. und Hanafusa, H. (1988), 'A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C.', *Nature* **332**(6161), 272–275.

- McCarthy, J., Hopwood, F., Oxley, D., Laver, M., Castagna, A., Righetti, P. G., Williams, K. und Herbert, B. (2003), 'Carbamylation of proteins in 2-D electrophoresis—myth or reality?', *Journal of Proteome Research* **2**(3), 239–242.
- McDannold, N., Arvanitis, C. D., Vykhodtseva, N. und Livingstone, M. S. (2012), 'Temporary Disruption of the Blood-Brain Barrier by Use of Ultrasound and Microbubbles: Safety and Efficacy Evaluation in Rhesus Macaques', *Cancer research* **72**(14), 3652–3663.
- McGhee, J. R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M. T., Eldridge, J. H., Hirasawa, M. und Kiyono, H. (1992), 'The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development', *Vaccine* **10**(2), 75–88.
- McGranahan, N., Furness, A. J. S., Rosenthal, R., Ramskov, S., Lyngaa, R., Saini, S. K., Jamal-Hanjani, M., Wilson, G. A., Birkbak, N. J., Hiley, C. T., Watkins, T. B. K., Shafi, S., Murugaesu, N., Mitter, R., Akarca, A. U., Linares, J., Marafioti, T., Henry, J. Y., Van Allen, E. M., Miao, D., Schilling, B., Schadendorf, D., Garraway, L. A., Makarov, V., Rizvi, N. A., Snyder, A., Hellmann, M. D., Merghoub, T., Wolchok, J. D., Shukla, S. A., Wu, C. J., Peggs, K. S., Chan, T. A., Hadrup, S. R., Quezada, S. A. und Swanton, C. (2016), 'Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade.', *Science* **351**(6280), 1463–1469.
- Meacham, C. E. und Morrison, S. J. (2013), 'Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity.', *Nature* **501**(7467), 328–337.
- Medawar, P. B. (1948), 'Immunity to Homologous Grafted Skin. III. The Fate of Skin Homographs Transplanted to the Brain, to Subcutaneous Tissue, and to the Anterior Chamber of the Eye', *British journal of experimental pathology* **29**(1), 58–69.
- Miller, C. R. und Perry, A. (2007), 'Glioblastoma - Morphologic and molecular genetic diversity', *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **131**(3), 397–406.
- Miller, C. T., Chen, G., Gharib, T. G., Wang, H., Thomas, D. G., Misek, D. E., Giordano, T. J., Yee, J., Orringer, M. B., Hanash, S. M. und Beer, D. G. (2003), 'Increased C-CRK proto-oncogene expression is associated with an aggressive phenotype in lung adenocarcinomas', *Oncogene* **22**(39), 7950–7957.
- Mirandola, P., Ponti, C., Gobbi, G., Sponzilli, I., Vaccarezza, M., Cocco, L., Zauli, G., Secchiero, P., Manzoli, F. A. und Vitale, M. (2004), 'Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity', *Blood* **104**(8), 2418–2424.
- Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., Yamamoto, M. und Motohashi, H. (2012), 'Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming.', *Cancer Cell* **22**(1), 66–79.

- Müller, A., Brandenburg, S., Turkowski, K., Müller, S. und Vajkoczy, P. (2015), 'Resident microglia, and not peripheral macrophages, are the main source of brain tumor mononuclear cells.', *International journal of cancer. Journal international du cancer* **137**(2), 278–288.
- Munder, M., Eichmann, K., Morán, J. M., Centeno, F., Soler, G. und Modolell, M. (1999), 'Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells.', *Journal of Immunology* **163**(7), 3771–3777.
- Murphy, K. P., Travers, P., Walport, M. und Janeway, C. (2012), *Janeway's immunobiology*, Garland Pub.
- Nag, S. (2003), 'Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels.', *Methods in molecular medicine* **89**, 3–36.
- Nagai, S., Moreno, O., Smith, C. A., Ivanchuk, S., Romagnuolo, R., Golbourn, B., Weeks, A., Seol, H. J. und Rutka, J. T. (2012), 'Role of the Cofilin Activity Cycle in Astrocytoma Migration and Invasion', *Genes & cancer* **2**(9), 859–869.
- Nakagawa, S., Deli, M. A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimono, T., Kittel, Á., Tanaka, K. und Niwa, M. (2009), 'A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes.', *Neurochemistry international* **54**(3-4), 253–263.
- Nelson, B. H. (2010), 'CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes.', *The Journal of Immunology* **185**(9), 4977–4982.
- Nguyen, L. V., Vanner, R., Dirks, P. und Eaves, C. J. (2012), 'Cancer stem cells: an evolving concept.', *Nature Reviews Cancer* **12**(2), 133–143.
- Nishihara, H., Tanaka, S., Tsuda, M., Oikawa, S. und Maeda, M. (2002), 'Molecular and immunohistochemical analysis of signaling adaptor protein Crk in human cancers', *Cancer Letters* **180**, 55–61.
- Nord, H., Hartmann, C., Andersson, R., Menzel, U., Pfeifer, S., Piotrowski, A., Bogdan, A., Kloc, W., Sandgren, J., Olofsson, T., Hesselager, G., Blomquist, E., Komorowski, J., von Deimling, A., Bruder, C. E. G., Dumanski, J. P. und Díaz de Ståhl, T. (2009), 'Characterization of novel and complex genomic aberrations in glioblastoma using a 32K BAC array.', *Neuro-Oncology* **11**(6), 803–818.
- Noushmehr, H., Weisenberger, D. J., Diefes, K., Phillips, H. S., Pujara, K., Berman, B. P., Pan, F., Pelloski, C. E., Sulman, E. P., Bhat, K. P., Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Hayes, D. N., Perou, C. M., Schmidt, H. K., Ding, L., Wilson, R. K., Van Den Berg, D., Shen, H., Bengtsson, H., Neuvial, P., Cope, L. M., Buckley, J., Herman, J. G., Baylin, S. B., Laird, P. W., Aldape, K. und The Cancer Genome Atlas Research Network (2010), 'Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma.', *Cancer Cell* **17**(5), 510–522.

- Novellino, L., Castelli, C. und Parmiani, G. (2004), 'A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update', *Cancer Immunology, Immunotherapy* **54**(3), 187–207.
- Novotný, J., Brucoleri, R., Newell, J., Murphy, D., Haber, E. und Karplus, M. (1983), 'Molecular anatomy of the antibody binding site.', *Journal of Biological Chemistry* **258**(23), 14433–14437.
- Nugent, C., Kumar, A. und Kuus-Reichel, K. (2005), 'MHC bridging system for detecting CTL-mediated lysis of antigen presenting cells'. US Patent Office.
- Oble, D. A., Loewe, R., Yu, P. und Mihm, M. C. (2009), 'Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma.', *Cancer immunity* **9**, 3.
- Ogden, A. T., Horgan, D., Waziri, A., Anderson, D., Louca, J., McKhann, G. M., Sisti, M. B., Parsa, A. T. und Bruce, J. N. (2006), 'Defective receptor expression and dendritic cell differentiation of monocytes in glioblastomas.', *Neurosurgery* **59**(4), 902–910.
- Ohgaki, H. und Kleihues, P. (2013), 'The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma', *Clinical cancer research* **19**(4), 764–772.
- Okada, H., Butterfield, L. H., Hamilton, R. L., Hoji, A., Sakaki, M., Ahn, B. J., Kohanbash, G., Drappatz, J., Engh, J., Amankulor, N., Lively, M. O., Chan, M. D., Salazar, A. M., Shaw, E. G., Potter, D. M. und Lieberman, F. S. (2015), 'Induction of robust type-I CD8+ T-cell responses in WHO grade 2 low-grade glioma patients receiving peptide-based vaccines in combination with poly-ICLC.', *Clinical cancer research* **21**(2), 286–294.
- Okada, H., Kalinski, P., Ueda, R., Hoji, A., Kohanbash, G., Donegan, T. E., Mintz, A. H., Engh, J. A., Bartlett, D. L., Brown, C. K., Zeh, H., Holtzman, M. P., Reinhart, T. A., Whiteside, T. L., Butterfield, L. H., Hamilton, R. L., Potter, D. M., Pollack, I. F., Salazar, A. M. und Lieberman, F. S. (2011), 'Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with alpha-type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma.', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**(3), 330–336.
- Okada, H., Low, K. L., Kohanbash, G., McDonald, H. A., Hamilton, R. L. und Pollack, I. F. (2008), 'Expression of glioma-associated antigens in pediatric brain stem and non-brain stem gliomas.', *Journal of Neuro-Oncology* **88**(3), 245–250.
- Okano, F., Storkus, W. J., Chambers, W. H., Pollack, I. F. und Okada, H. (2002), 'Identification of a Novel HLA-A*0201-restricted, Cytotoxic T Lymphocyte Epitope in a Human Glioma-associated Antigen, Interleukin 13 Receptor α 2 Chain', *Clinical cancer research* **8**(9), 2851–2855.

- Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Fulop, J., Liu, M., Blanda, R., Kromer, C., Wolinsky, Y., Kruchko, C. und Barnholtz-Sloan, J. S. (2015), 'CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012.', *Neuro-Oncology* **17**, iv1–iv62.
- Pachter, J. S., de Vries, H. E. und Fabry, Z. (2003), 'The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system.', *Journal of neuropathology and experimental neurology* **62**(6), 593–604.
- Palucka, A. K. und Coussens, L. M. (2016), 'The Basis of Oncoimmunology.', *Cell* **164**(6), 1233–1247.
- Pardridge, W. M. (2010), 'Biopharmaceutical drug targeting to the brain', *Journal of Drug Targeting* **18**(3), 157–167.
- Park, J.-B., Agnihotri, S., Golbourn, B., Bertrand, K. C., Luck, A., Sabha, N., Smith, C. A., Byron, S., Zadeh, G., Croul, S., Berens, M. und Rutka, J. T. (2014), 'Transcriptional profiling of GBM invasion genes identifies effective inhibitors of the LIM kinase-Cofilin pathway', *Oncotarget* **5**(19), 9382–9395.
- Parmiani, G., Castelli, C., Dalerba, P., Mortarini, R., Rivoltini, L., Marincola, F. M. und Anichini, A. (2002), 'Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going?', *Journal of the National Cancer Institute* **94**(11), 805–818.
- Parney, I. F., Waldron, J. S. und Parsa, A. T. (2009), 'Flow cytometry and in vitro analysis of human glioma-associated macrophages', *Journal of neurosurgery* **110**(3), 572–582.
- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., Hartigan, J., Smith, D. R., Strausberg, R. L., Marie, S. K. N., Shinjo, S. M. O., Yan, H., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V. E. und Kinzler, K. W. (2008), 'An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme.', *Science* **321**(5897), 1807–1812.
- Patra, K. C. und Hay, N. (2014), 'The pentose phosphate pathway and cancer', *Trends in biochemical sciences* **39**(8), 347–354.
- Paul, S., Weiskopf, D., Angelo, M. A., Sidney, J., Peters, B. und Sette, A. (2013), 'HLA class I alleles are associated with peptide-binding repertoires of different size, affinity, and immunogenicity.', *The Journal of Immunology* **191**(12), 5831–5839.
- Pauthner, M., Yeung, J., Ullman, C., Bakker, J. und Wurch, T. (2016), 'Antibody engineering & therapeutics, the annual meeting of the antibody society December 7–10, 2015, San Diego, CA, USA', *MAbs* **8**(3), 617–652.

- Perry, A. und Wesseling, P. (2016), 'Histologic classification of gliomas.', *Handbook of clinical neurology* **134**, 71–95.
- Pesheva, P., Gennarini, G., Goridis, C. und Schachner, M. (1993), 'The F3/11 cell adhesion molecule mediates the repulsion of neurons by the extracellular matrix glycoprotein J1-160/180.', *Neuron* **10**(1), 69–82.
- Peters, B., Bulik, S., Tampe, R., Van Endert, P. M. und Holzhütter, H.-G. (2003), 'Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors.', *Journal of Immunology* **171**(4), 1741–1749.
- Phuphanich, S., Wheeler, C. J., Rudnick, J. D., Mazer, M., Wang, H., Nuño, M. A., Richardson, J. E., Fan, X., Ji, J., Chu, R. M., Bender, J. G., Hawkins, E. S., Patil, C. G., Black, K. L. und Yu, J. S. (2013), 'Phase I trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma.', *Cancer Immunology, Immunotherapy* **62**(1), 125–135.
- Pieper, K., Grimbacher, B. und Eibel, H. (2013), 'B-cell biology and development', *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **131**(4), 959–971.
- Pittet, M. J., Zippelius, A., Speiser, D. E., Assenmacher, M., Guillaume, P., Valmori, D., Liénard, D., Lejeune, F., Cerottini, J.-C. und Romero, P. (2001), 'Ex Vivo IFN- γ Secretion by Circulating CD8 T Lymphocytes: Implications of a Novel Approach for T Cell Monitoring in Infectious and Malignant Diseases', *Journal of Immunology* **166**(12), 7634–7640.
- Plautz, G. E., Miller, D. W., Barnett, G. H., Stevens, G. H., Maffett, S., Kim, J., Cohen, P. A. und Shu, S. (2000), 'T cell adoptive immunotherapy of newly diagnosed gliomas.', *Clinical cancer research* **6**(6), 2209–2218.
- Popko, B. (2003), 'Notch signaling: a rheostat regulating oligodendrocyte differentiation?', *Developmental cell* **5**(5), 668–669.
- Postel, E. H., Berberich, S. J., Flint, S. J. und Ferrone, C. A. (1993), 'Human c-myc transcription factor PuF identified as nm23-H2 nucleoside diphosphate kinase, a candidate suppressor of tumor metastasis.', *Science* **261**(5120), 478–480.
- Pouratian, N. und Schiff, D. (2010), 'Management of low-grade glioma.', *Current neurology and neuroscience reports* **10**(3), 224–231.
- Prasad, G. und Haas-Kogan, D. A. (2009), 'Radiation-induced gliomas.', *Expert review of neurotherapeutics* **9**(10), 1511–1517.
- Prensner, J. R. und Chinnaiyan, A. M. (2011), 'Metabolism unhinged: IDH mutations in cancer', *Nature Medicine* **17**(3), 291–293.

- Prenzel, N., Fischer, O. M., Streit, S., Hart, S. und Ullrich, A. (2001), 'The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification', *Endocrine-Related Cancer* **8**(1), 11–31.
- Prosser, S., Sorokina, E., Pratt, P. und Sorokin, A. (2003), 'CrkIII: a novel and biologically distinct member of the Crk family of adaptor proteins.', *Oncogene* **22**(31), 4799–4806.
- Pyonteck, S. M., Akkari, L., Schuhmacher, A. J., Bowman, R. L., Sevenich, L., Quail, D. F., Olson, O. C., Quick, M. L., Huse, J. T., Teijeiro, V., Setty, M., Leslie, C. S., Oei, Y., Pedraza, A., Zhang, J., Brennan, C. W., Sutton, J. C., Holland, E. C., Daniel, D. und Joyce, J. A. (2013a), 'CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression', *Nature Medicine* **19**(10), 1264–1272.
- Pyonteck, S. M., Akkari, L., Schuhmacher, A. J., Bowman, R. L., Sevenich, L., Quail, D. F., Olson, O. C., Quick, M. L., Huse, J. T., Teijeiro, V., Setty, M., Leslie, C. S., Oei, Y., Pedraza, A., Zhang, J., Brennan, C. W., Sutton, J. C., Holland, E. C., Daniel, D. und Joyce, J. A. (2013b), 'CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression', *Nature Medicine* **19**(10), 1264–1272.
- Qin, T., Wang, C., Chen, X., Duan, C., Zhang, X., Zhang, J., Chai, H., Tang, T., Chen, H., Yue, J., Li, Y. und Yang, J. (2015), 'Dopamine induces growth inhibition and vascular normalization through reprogramming M2-polarized macrophages in rat C6 glioma.', *Toxicology and applied pharmacology* **286**(2), 112–123.
- Rammensee, H.-G., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A. und Stevanović, S. (1999), 'SYF-PEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs.', *Immunogenetics* **50**(3-4), 213–219.
- Ransohoff, R. M., Kivisäkk, P. und Kidd, G. (2003), 'Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system', *Nature reviews. Immunology* **3**(7), 569–581.
- Razavi, S.-M., Lee, K. E., Jin, B. E., Aujla, P. S., Gholamin, S. und Li, G. (2016), 'Immune Evasion Strategies of Glioblastoma', *Frontiers in Surgery* **3**(32), 796856.
- Reardon, D. A., Freeman, G., Wu, C., Chiocca, E. A., Wucherpennig, K. W., Wen, P. Y., Fritsch, E. F., Curry, W. T., Sampson, J. H. und Dranoff, G. (2014), 'Immunotherapy advances for glioblastoma.', *Neuro-Oncology* **16**(11), 1441–1458.
- Reichman, C. T., Mayer, B. J., Keshav, S. und Hanafusa, H. (1992), 'The product of the cellular crk gene consists primarily of SH2 and SH3 regions.', *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **3**(7), 451–460.
- Reifenberger, G., Reifenberger, J., Ichimura, K. und Collins, V. P. (1995), 'Amplification at 12q13-14 in human malignant gliomas is frequently accompanied by loss of heterozygosity at loci proximal and distal to the amplification site.', *Cancer research* **55**(4), 731–734.

- Ren, D., Pipes, G. D., Liu, D., Shih, L.-Y., Nichols, A. C., Treuheit, M. J., Brems, D. N. und Bondarenko, P. V. (2009), 'An improved trypsin digestion method minimizes digestion-induced modifications on proteins', *Analytical Biochemistry* **392**(1), 12–21.
- Reuss, D. E., Kratz, A., Sahm, F., Capper, D., Schrimpf, D., Koelsche, C., Hovestadt, V., Bewerunge-Hudler, M., Jones, D. T. W., Schittenhelm, J., Mittelbronn, M., Rushing, E., Simon, M., Westphal, M., Unterberg, A., Platten, M., Paulus, W., Reifenberger, G., Tonn, J.-C., Aldape, K., Pfister, S. M., Korshunov, A., Weller, M., Herold-Mende, C., Wick, W., Brandner, S. und von Deimling, A. (2015), 'Adult IDH wild type astrocytomas biologically and clinically resolve into other tumor entities.', *Acta neuropathologica* **130**(3), 407–417.
- Reuss, D. E., Sahm, F., Schrimpf, D., Wiestler, B., Capper, D., Koelsche, C., Schweizer, L., Korshunov, A., Jones, D. T. W., Hovestadt, V., Mittelbronn, M., Schittenhelm, J., Herold-Mende, C., Unterberg, A., Platten, M., Weller, M., Wick, W., Pfister, S. M. und von Deimling, A. (2014), 'ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry with subsequent copy number analysis and IDH sequencing as a basis for an "integrated" diagnostic approach for adult astrocytoma, oligodendroglioma and glioblastoma', *Acta neuropathologica* **129**(1), 133–146.
- Ries, C. H., Cannarile, M. A., Hoves, S., Benz, J., Wartha, K., Runza, V., Rey-Giraud, F., Pradel, L. P., Feuerhake, F., Klamann, I., Jones, T., Jucknischke, U., Scheiblich, S., Kaluza, K., Gorr, I. H., Walz, A., Abiraj, K., Cassier, P. A., Sica, A., Gomez-Roca, C., de Visser, K. E., Italiano, A., Le Tourneau, C., Deldord, J.-P., Levitsky, H., Blay, J.-Y. und Rüttinger, D. (2014), 'Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy.', *Cancer Cell* **25**(6), 846–859.
- Robbins, P. F., Lu, Y.-C., El-Gamil, M., Li, Y. F., Gross, C., Gartner, J., Lin, J. C., Teer, J. K., Cliften, P., Tycksen, E., Samuels, Y. und Rosenberg, S. A. (2013), 'Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells', *Nature Medicine* **19**(6), 747–752.
- Rodrigues, S. P., Fathers, K. E., Chan, G., Zuo, D., Halwani, F., Meterissian, S. und Park, M. (2005), 'Crkl and Crkl function as key signaling integrators for migration and invasion of cancer cells.', *Molecular cancer research : MCR* **3**(4), 183–194.
- Rome, C., Loiseau, H., Arsaut, J., Roullot, V. und Couillaud, F. (2006), 'Diversity of contactin mRNA in human brain tumors.', *Molecular Carcinogenesis* **45**(10), 774–785.
- Rousalova, I. und Krepela, E. (2010), 'Granzyme B-induced apoptosis in cancer cells and its regulation.', *International Journal of Oncology* **37**(6), 1361–1378.
- Rusciano, D. (2000), 'Differentiation and metastasis in melanoma.', *Critical reviews in oncogenesis* **11**(2), 147–163.

- Sait, S., Fawcett, T. und Blanck, G. (2016), 'Overlap of the cancer genome atlas and the immune epitope database.', *Oncology letters* **12**(4), 2982–2984.
- Sallam, R. M. (2015), 'Proteomics in Cancer Biomarkers Discovery: Challenges and Applications', *Disease Markers* **2015**(109), 1–12.
- Sallusto, F., Geginat, J. und Lanzavecchia, A. (2004), 'Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance.', **22**(1), 745–763.
- Sampson, J. H., Aldape, K. D., Archer, G. E., Coan, A., Desjardins, A., Friedman, A. H., Friedman, H. S., Gilbert, M. R., Herndon, J. E., McLendon, R. E., Mitchell, D. A., Reardon, D. A., Sawaya, R., Schmittling, R., Shi, W., Vredenburgh, J. J., Bigner, D. D. und Heimberger, A. B. (2011), 'Greater chemotherapy-induced lymphopenia enhances tumor-specific immune responses that eliminate EGFRvIII-expressing tumor cells in patients with glioblastoma.', *Neuro-Oncology* **13**(3), 324–333.
- Sampson, J. H., Archer, G. E., Mitchell, D. A., Heimberger, A. B., Herndon, J. E., Lally-Goss, D., McGehee-Norman, S., Paolino, A., Reardon, D. A., Friedman, A. H., Friedman, H. S. und Bigner, D. D. (2009), 'An epidermal growth factor receptor variant III-targeted vaccine is safe and immunogenic in patients with glioblastoma multiforme.', *Molecular Cancer Therapeutics* **8**(10), 2773–2779.
- Schenk, G., Duggleby, R. G. und Nixon, P. F. (1998), 'Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase', *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **30**(12), 1297–1318.
- Schietinger, A., Philip, M. und Schreiber, H. (2008), 'Specificity in cancer immunotherapy.', *Seminars in immunology* **20**(5), 276–285.
- Schiff, D., Brown, P. D. und Giannini, C. (2007), 'Outcome in adult low-grade glioma: the impact of prognostic factors and treatment.', *Neurology* **69**(13), 1366–1373.
- Schmidt, M., Böhm, D., von Törne, C., Steiner, E., Puhl, A., Pilch, H., Lehr, H.-A., Hengstler, J. G., Kölbl, H. und Gehrman, M. (2008), 'The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer.', *Cancer research* **68**(13), 5405–5413.
- Schmits, R., Cochlovius, B., Treitz, G., Regitz, E., Ketter, R., Preuss, K. D., Romeike, B. F. M. und Pfreundschuh, M. (2002), 'Analysis of the antibody repertoire of astrocytoma patients against antigens expressed by gliomas', *International Journal of Cancer* **98**(1), 73–77.
- Schmitz, M., Wehner, R., Stevanovic, S., Kiessling, A., Rieger, M. A., Temme, A., Bachmann, M., Rieber, E. P. und Weigle, B. (2007), 'Identification of a naturally processed T cell epitope derived from the glioma-associated protein SOX11', *Cancer Letters* **245**(1-2), 331–336.

- Schumacher, T., Bunse, L., Pusch, S., Sahm, F., Wiestler, B., Quandt, J., Menn, O., Osswald, M., Oezen, I., Ott, M., Keil, M., Balss, J., Rauschenbach, K., Grabowska, A. K., Vogler, I., Diekmann, J., Trautwein, N., Eichmüller, S. B., Okun, J., Stevanovic, S., Riemer, A. B., Sahin, U., Friese, M. A., Beckhove, P., von Deimling, A., Wick, W. und Platten, M. (2014), 'A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity.', *Nature* **512**(7514), 324–327.
- Schumacher, T. N. und Schreiber, R. D. (2015), 'Neoantigens in cancer immunotherapy', *Science* **348**(6230), 69–74.
- Schwartzentruber, D. J., Lawson, D. H., Richards, J. M., Conry, R. M., Miller, D. M., Treisman, J., Gailani, F., Riley, L., Conlon, K., Pockaj, B., Kendra, K. L., White, R. L., Gonzalez, R., Kuzel, T. M., Curti, B., Leming, P. D., Whitman, E. D., Balkissoon, J., Reintgen, D. S., Kaufman, H., Marincola, F. M., Merino, M. J., Rosenberg, S. A., Choyke, P., Vena, D. und Hwu, P. (2011), 'gp100 Peptide Vaccine and Interleukin-2 in Patients with Advanced Melanoma', *New England Journal of Medicine* **364**(22), 2119–2127.
- Scott, A. M., Wolchok, J. D. und Old, L. J. (2012), 'Antibody therapy of cancer.', *Nature Reviews Cancer* **12**(4), 278–287.
- Shaheed, S.-u., Rustogi, N., Scally, A., Wilson, J., Thygesen, H., Loizidou, M. A., Hadjisavvas, A., Hanby, A., Speirs, V., Loadman, P., Linforth, R., Kyriacou, K. und Sutton, C. W. (2013), 'Identification of Stage-Specific Breast Markers Using Quantitative Proteomics', *Journal of Proteome Research* **12**(12), 5696–5708.
- Sheriff, S., Silverton, E. W., Padlan, E. A., Cohen, G. H., Smith-Gill, S. J., Finzel, B. C. und Davies, D. R. (1987), 'Three-dimensional structure of an antibody-antigen complex', *PNAS* **84**(22), 8075–8079.
- Shulman, Z., Gitlin, A. D., Weinstein, J. S., Lainez, B., Esplugues, E., Flavell, R. A., Craft, J. E. und Nussenzweig, M. C. (2014), 'Dynamic signaling by T follicular helper cells during germinal center B cell selection', *Science* **345**(6200), 1058–1062.
- Sidney, J., del Guercio, M. F., Southwood, S., Engelhard, V. H., Appella, E., Rammensee, H. G., Falk, K., Rötzschke, O., Takiguchi, M. und Kubo, R. T. (1995), 'Several HLA alleles share overlapping peptide specificities.', *Journal of Immunology* **154**(1), 247–259.
- Simmons, G. W., Pong, W. W., Emmett, R. J., White, C. R., Gianino, S. M., Rodriguez, F. J. und Gutmann, D. H. (2011), 'Neurofibromatosis-1 heterozygosity increases microglia in a spatially and temporally restricted pattern relevant to mouse optic glioma formation and growth.', *Journal of neuropathology and experimental neurology* **70**(1), 51–62.

- Singh-Jasuja, H., Emmerich, N. P. N. und Rammensee, H.-G. (2004), 'The Tübingen approach: identification, selection, and validation of tumor-associated HLA peptides for cancer therapy.', *Cancer Immunology, Immunotherapy* **53**(3), 187–195.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D. und Dirks, P. B. (2004), 'Identification of human brain tumour initiating cells.', *Nature* **432**(7015), 396–401.
- Sluyterman, L. A. A. E. und Elgersma, O. (1978), 'Chromatofocusing: Isoelectric focusing on ion-exchange columns', *Journal of Chromatography A* **150**(1), 17–30.
- Smith, J. S., Chang, E. F., Lamborn, K. R., Chang, S. M., Prados, M. D., Cha, S., Tihan, T., Vandenberg, S., McDermott, M. W. und Berger, M. S. (2008), 'Role of Extent of Resection in the Long-Term Outcome of Low-Grade Hemispheric Gliomas', *Journal of Clinical Oncology* **26**(8), 1338–1345.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985), 'Measurement of protein using bicinchoninic acid', *Analytical Biochemistry* **150**(1), 76–85.
- Smith, Q. R. (2000), 'Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier.', *The Journal of Nutrition* **130**(4S Suppl), 1016S–22S.
- Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., Yuan, J., Zaretsky, J. M., Desrichard, A., Walsh, L. A., Postow, M. A., Wong, P., Ho, T. S., Hollmann, T. J., Bruggeman, C., Kannan, K., Li, Y., Elipenahli, C., Liu, C., Harbison, C. T., Wang, L., Ribas, A., Wolchok, J. D. und Chan, T. A. (2014), 'Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma.', *New England Journal of Medicine* **371**(23), 2189–2199.
- Stemberger, C., Huster, K. M., Koffler, M., Anderl, F., Schiemann, M., Wagner, H. und Busch, D. H. (2007), 'A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets.', *Immunity* **27**(6), 985–997.
- Stockhausen, M. T., Kristoffersen, K. und Poulsen, H. S. (2010), 'The functional role of Notch signaling in human gliomas', *Neuro-Oncology* **12**(2), 199–211.
- Strle, K., Zhou, J. H., Shen, W. H., Broussard, S. R., Johnson, R. W., Freund, G. G., Dantzer, R. und Kelley, K. W. (2001), 'Interleukin-10 in the brain.', *Critical reviews in immunology* **21**(5), 427–449.
- Stummer, W., Reulen, H.-J., Meinel, T., Pichlmeier, U., Schumacher, W., Tonn, J.-C., Rohde, V., Oettel, F., Turowski, B., Woiciechowsky, C., Franz, K., Pietsch, T. und ALA-Glioma Study Group (2008), 'Extent of resection and survival in glioblastoma multiforme: identification of and adjustment for bias.', *Neurosurgery* **62**(3), 564–76– discussion 564–76.

- Stupp, R., Hottinger, A., Hegi, M. E. und Weller, M. (2013), 'Diagnostik und Therapie von Gliomen', *Schweiz Med Forum* **13**(22), 421–426.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., Mirimanoff, R. O., European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups und National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005), 'Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma.', *New England Journal of Medicine* **352**(10), 987–996.
- Suzuki, H., Aoki, K., Chiba, K., Sato, Y., Shiozawa, Y., Shiraishi, Y., Shimamura, T., Niida, A., Motomura, K., Ohka, F., Yamamoto, T., Tanahashi, K., Ranjit, M., Wakabayashi, T., Yoshizato, T., Kataoka, K., Yoshida, K., Nagata, Y., Sato-Otsubo, A., Tanaka, H., Sanada, M., Kondo, Y., Nakamura, H., Mizoguchi, M., Abe, T., Muragaki, Y., Watanabe, R., Ito, I., Miyano, S., Natsume, A. und Ogawa, S. (2015), 'Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas', *Nature Genetics* **47**(5), 458–468.
- Tait, M. J., Petrik, V., Loosemore, A., Bell, B. A. und Papadopoulos, M. C. (2009), 'Survival of patients with glioblastoma multiforme has not improved between 1993 and 2004: analysis of 625 cases', *British Journal of Neurosurgery* **21**(5), 496–500.
- ten Hoeve, J., Morris, C., Heisterkamp, N. und Groffen, J. (1993), 'Isolation and chromosomal localization of CRKL, a human crk-like gene.', *Oncogene* **8**(9), 2469–2474.
- Tenzer, S., Peters, B., Bulik, S., Schoor, O., Lemmel, C., Schatz, M. M., Kloetzel, P. M., Rammensee, H. G., Schild, H. und Holzhütter, H. G. (2005), 'Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding', *Cellular and Molecular Life Sciences* **62**(9), 1025–1037.
- Tiemessen, M. M., Jagger, A. L., Evans, H. G., van Herwijnen, M. J. C., John, S. und Taams, L. S. (2007), 'CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages.', *PNAS* **104**(49), 19446–19451.
- Tiemessen, M. M., Kunzmann, S., Schmidt-Weber, C. B., Garssen, J., Bruijnzeel-Koomen, C. A. F. M., Knol, E. F. und van Hoffen, E. (2003), 'Transforming growth factor-beta inhibits human antigen-specific CD4+ T cell proliferation without modulating the cytokine response.', *International Immunology* **15**(12), 1495–1504.
- Toedt, G., Barbus, S., Wolter, M., Felsberg, J., Tews, B., Blond, F., Sabel, M. C., Hofmann, S., Becker, N., Hartmann, C., Ohgaki, H., von Deimling, A., Wiestler, O. D., Hahn, M., Lichter, P., Reifenberger, G. und Radlwimmer, B. (2011), 'Molecular signatures classify astrocytic gliomas by IDH1 mutation status.', *International journal of cancer. Journal international du cancer* **128**(5), 1095–1103.

- Tough, D. F. und Sprent, J. (1995), 'Life span of naive and memory t cells', *Stem Cells* **13**(3), 242–249.
- Tschiedel, S., Gentilini, C., Lange, T., Wölfel, C., Wölfel, T., Lennerz, V., Stevanović, S., Rammensee, H. G., Huber, C., Cross, M. und Niederwieser, D. (2008), 'Identification of NM23-H2 as a tumour-associated antigen in chronic myeloid leukaemia.', *Leukemia* **22**(8), 1542–1550.
- Tsuboi, K., Saijo, K., Ishikawa, E., Tsurushima, H., Takano, S., Morishita, Y. und Ohno, T. (2003), 'Effects of local injection of ex vivo expanded autologous tumor-specific T lymphocytes in cases with recurrent malignant gliomas.', *Clinical cancer research* **9**(9), 3294–3302.
- Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L. A. und Fang, F. (2012), 'IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype', *Nature* **483**(7390), 479–483.
- Turhani, D., Krapfenbauer, K., Thurnher, D., Langen, H. und Fountoulakis, M. (2006), 'Identification of differentially expressed, tumor-associated proteins in oral squamous cell carcinoma by proteomic analysis', *ELECTROPHORESIS* **27**(7), 1417–1423.
- Turner, J. R. (2009), 'Intestinal mucosal barrier function in health and disease.', *Nature reviews. Immunology* **9**(11), 799–809.
- Tzschucke, C. C., Markert, C. und Bannwarth, W. (2002), 'Modern separation techniques for the efficient workup in organic synthesis', *Angewandte Chemie* **41**, 3964–4000.
- Uhlen, M., Oksvold, P., Fagerberg, L., Lundberg, E., Jonasson, K., Forsberg, M., Zwahlen, M., Kampf, C., Wester, K., Hober, S., Wernerus, H., Björling, L. und Ponten, F. (2010), 'Towards a knowledge-based Human Protein Atlas', *Nature Publishing Group* **28**(12), 1248–1250.
- UniProt Consortium (2015), 'UniProt: a hub for protein information.', *Nucleic Acids Research* **43**(Database issue), D204–D212.
- van den Bent, M. J., Snijders, T. J. und Bromberg, J. E. C. (2012), 'Current treatment of low grade gliomas.', *Memo* **5**(3), 223–227.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. und Boon, T. (1991), 'A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.', *Science* **254**(5038), 1643–1647.
- van Tellingen, O., Yetkin-Arik, B., de Gooijer, M. C., Wesseling, P., Wurdinger, T. und de Vries, H. E. (2015), 'Overcoming the blood–brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment', *Drug Resistance Updates* **19**, 1–12.
- van Zwam, M., Huizinga, R., Melief, M.-J., Wierenga-Wolf, A. F., van Meurs, M., Voerman, J. S., Biber, K. P. H., Boddeke, H. W. G. M., Höpken, U. E., Meisel, C., Meisel, A., Bechmann, I., Hintzen, R. Q.,

- 't Hart, B. A., Amor, S., Laman, J. D. und Boven, L. A. (2009), 'Brain antigens in functionally distinct antigen-presenting cell populations in cervical lymph nodes in MS and EAE.', *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **87**(3), 273–286.
- Vega, E. A., Graner, M. W. und Sampson, J. H. (2008), 'Combating immunosuppression in glioma.', *Future oncology (London, England)* **4**(3), 433–442.
- Virchow, R. (1858), 'Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre', Hirschwald.
- Virgintino, D., Ambrosini, M., D'Errico, P., Bertossi, M., Papadaki, C., Karagogeos, D. und Gennarini, G. (1999), 'Regional distribution and cell type-specific expression of the mouse F3 axonal glycoprotein: a developmental study.', *The Journal of comparative neurology* **413**(3), 357–372.
- Vita, R., Zarebski, L., Greenbaum, J. A., Emami, H., Hoof, I., Salimi, N., Damle, R., Sette, A. und Peters, B. (2009), 'The Immune Epitope Database 2.0', *Nucleic Acids Research* **38**(Database), D854–D862.
- Völker, H.-U., Hagemann, C., Coy, J., Wittig, R., Sommer, S., Stojic, J., Haubitz, I., Vince, G. H., Kämmerer, U. und Monoranu, C.-M. (2008), 'Expression of Transketolase-like 1 and Activation of Akt in Grade IV Glioblastomas Compared With Grades II and III Astrocytic Gliomas', *American journal of clinical pathology* **130**(1), 50–57.
- Wagner, U. (2011), 'Immune senescence and autoimmunity', *Zeitschrift für Rheumatologie* **70**(2), 95–98.
- Wang, L., Tabu, K., Kimura, T., Tsuda, M., Linghu, H., Tanino, M., Kaneko, S., Nishihara, H. und Tanaka, S. (2007), 'Signaling adaptor protein Crk is indispensable for malignant feature of glioblastoma cell line KMG4.', *Biochemical and Biophysical Research Communications* **362**(4), 976–981.
- Wang, S., Guo, L., Liu, D., Liu, W. und Wu, Y. (2016), 'HLAsupE: an integrated database of HLA supertype-specific epitopes to aid in the development of vaccines with broad coverage of the human population', *BMC Immunology* **17**(1), 15.
- Ward, P. S., Patel, J., Wise, D. R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B. D., Collier, H. A., Cross, J. R., Fantin, V. R., Hedvat, C. V., Perl, A. E., Rabinowitz, J. D., Carroll, M., Su, S. M., Sharp, K. A., Levine, R. L. und Thompson, C. B. (2010), 'The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate.', *Cancer Cell* **17**(3), 225–234.
- Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P. und Ohgaki, H. (2009), 'IDH1 Mutations Are Early Events in the Development of Astrocytomas and Oligodendrogliomas', *The American Journal of Pathology* **174**(4), 1149–1153.

- Watts, C. (2004), 'The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules', *Nature immunology* **5**(7), 685–692.
- Weiner, G. J. (2015), 'Building better monoclonal antibody-based therapeutics', *Nature Reviews Cancer* **15**(6), 361–370.
- Weiner, H. L. (2001), 'Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells.', *Immunological reviews* **182**, 207–214.
- Weller, M., van den Bent, M., Hopkins, K. und Tonn, J. C. (2014), 'EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma', *The Lancet Oncology* **15**, e395–403.
- Wesseling, P., Bent, M. und Perry, A. (2015), 'Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanisms and markers', *Acta neuropathologica* **129**(6), 809–827.
- Wilson, E. H., Weninger, W. und Hunter, C. A. (2010), 'Trafficking of immune cells in the central nervous system.', *Journal of Clinical Investigation* **120**(5), 1368–1379.
- Wintterle, S., Schreiner, B., Mitsdoerffer, M., Schneider, D., Chen, L. P., Meyermann, R., Weller, M. und Wiendl, H. (2003), 'Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: A potential mechanism of immune paralysis', *Cancer research* **63**(21), 7462–7467.
- Wlodarczyk, A., Løbner, M., Cédile, O. und Owens, T. (2014), 'Comparison of microglia and infiltrating CD11c + cells as antigen presenting cells for T cell proliferation and cytokine response', *Journal of Neuroinflammation* **11**(1), 1.
- Woiciechowsky, C., Asadullah, K., Nestler, D., Schöning, B., Glöckner, F., Döcke, W.-D. und Volk, H.-D. (1998), 'Diminished monocytic HLA-DR expression and ex vivo cytokine secretion capacity in patients with glioblastoma: Effect of tumor extirpation', *Journal of Neuroimmunology* **84**(2), 164–171.
- Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S. und Vogelstein, B. (1992), 'Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas.', *PNAS* **89**(7), 2965–2969.
- Wooldridge, L., Lissina, A., Cole, D. K., van den Berg, H. A., Price, D. A. und Sewell, A. K. (2009), 'Tricks with tetramers: how to get the most from multimeric peptide–MHC', *Immunology* **126**(2), 147–164.
- Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T. und Condeelis, J. (2005), 'Molecular mechanisms of invadopodium formation', *The Journal of Cell Biology* **168**(3), 441–452.
- Yang, I., Han, S. J., Sughrue, M. E., Tihan, T. und Parsa, A. T. (2011), 'Immune cell infiltrate differences in pilocytic astrocytoma and glioblastoma: evidence of distinct immunological microenvironments that reflect tumor biology.', *Journal of neurosurgery* **115**(3), 505–511.

- Yeh, W.-L., Lu, D.-Y., Lin, C.-J., Liou, H.-C. und Fu, W.-M. (2007), 'Inhibition of hypoxia-induced increase of blood-brain barrier permeability by YC-1 through the antagonism of HIF-1 α accumulation and VEGF expression.', *Molecular pharmacology* **72**(2), 440–449.
- Yen, K. E., Bittinger, M. A., Su, S. M. und Fantin, V. R. (2010), 'Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities', *Oncogene* **29**(49), 6409–6417.
- Yu, J. S., Lee, P. K., Ehtesham, M., Samoto, K., Black, K. L. und Wheeler, C. J. (2003), 'Intratumoral T cell subset ratios and Fas ligand expression on brain tumor endothelium.', *Journal of Neuro-Oncology* **64**(1-2), 55–61.
- Yu, J. S., Liu, G., Ying, H., Yong, W. H., Black, K. L. und Wheeler, C. J. (2004), 'Vaccination with tumor lysate-pulsed dendritic cells elicits antigen-specific, cytotoxic T-cells in patients with malignant glioma.', *Cancer research* **64**(14), 4973–4979.
- Zagzag, D., Salnikow, K., Chiriboga, L., Yee, H., Lan, L., Ali, M. A., Garcia, R., Demaria, S. und Newcomb, E. W. (2005), 'Downregulation of major histocompatibility complex antigens in invading glioma cells: stealth invasion of the brain', *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **85**(3), 328–341.
- Zhang, F., Xu, C.-L. und Liu, C.-M. (2015), 'Drug delivery strategies to enhance the permeability of the blood–brain barrier for treatment of glioma', *Drug Design, Development and Therapy* **9**, 2089–2100.
- Zhang, J. G., Eguchi, J., Kruse, C. A., Gomez, G. G., Fakhrai, H., Schroter, S., Ma, W., Hoa, N., Minev, B., Delgado, C., Wepsic, H. T., Okada, H. und Judus, M. R. (2007), 'Antigenic Profiling of Glioma Cells to Generate Allogeneic Vaccines or Dendritic Cell-Based Therapeutics', *Clinical cancer research* **13**(2), 566–575.
- Zhang, J., Sarkar, S., Cua, R., Zhou, Y., Hader, W. und Yong, V. W. (2012), 'A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis', *Carcinogenesis* **33**(2), 312–319.
- Zhou, T., Wang, C. H., Yan, H., Zhang, R., Zhao, J. B., Qian, C. F., Xiao, H. und Liu, H. Y. (2016), 'Inhibition of the Rac1-WAVE2-Arp2/3 signaling pathway promotes radiosensitivity via downregulation of cofilin-1 in U251 human glioma cells.', *Molecular Medicine Reports* **13**(5), 4414–4420.
- Zhou, X., Spittau, B. und Kriegelstein, K. (2012), 'TGF β signalling plays an important role in IL4-induced alternative activation of microglia', *Journal of Neuroinflammation* **9**(1), 210.
- Zhou, Y. (2013), 'Immunosenescence: Mechanisms, Clinical Impacts, and Therapeutic Strategies', *Clinical Infectious Diseases* **56**(4), 618–619.

- Zhu, E. F., Gai, S. A., Opel, C. F., Kwan, B. H., Surana, R., Mihm, M. C., Kauke, M. J., Moynihan, K. D., Angelini, A., Williams, R. T., Stephan, M. T., Kim, J. S., Yaffe, M. B., Irvine, D. J., Weiner, L. M., Dranoff, G. und Wittrup, K. D. (2015), 'Synergistic Innate and Adaptive Immune Response to Combination Immunotherapy with Anti-Tumor Antigen Antibodies and Extended Serum Half-Life IL-2', *Cancer Cell* **27**(4), 489–501.
- Zisch, A. H., D'Alessandri, L., Ranscht, B., Falchetto, R., Winterhalter, K. H. und Vaughan, L. (1992), 'Neuronal cell adhesion molecule contactin/F11 binds to tenascin via its immunoglobulin-like domains.', *The Journal of Cell Biology* **119**(1), 203–213.
- Zonta, M., Angulo, M. C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A., Pozzan, T. und Carmignoto, G. (2003), 'Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation.', *Nature Neuroscience* **6**(1), 43–50.

6 Anhang

A IFN- γ ELISpots der 1D PF2D-Fraktionen

B IFN- γ ELISpots der 2D PF2D-Fraktionen

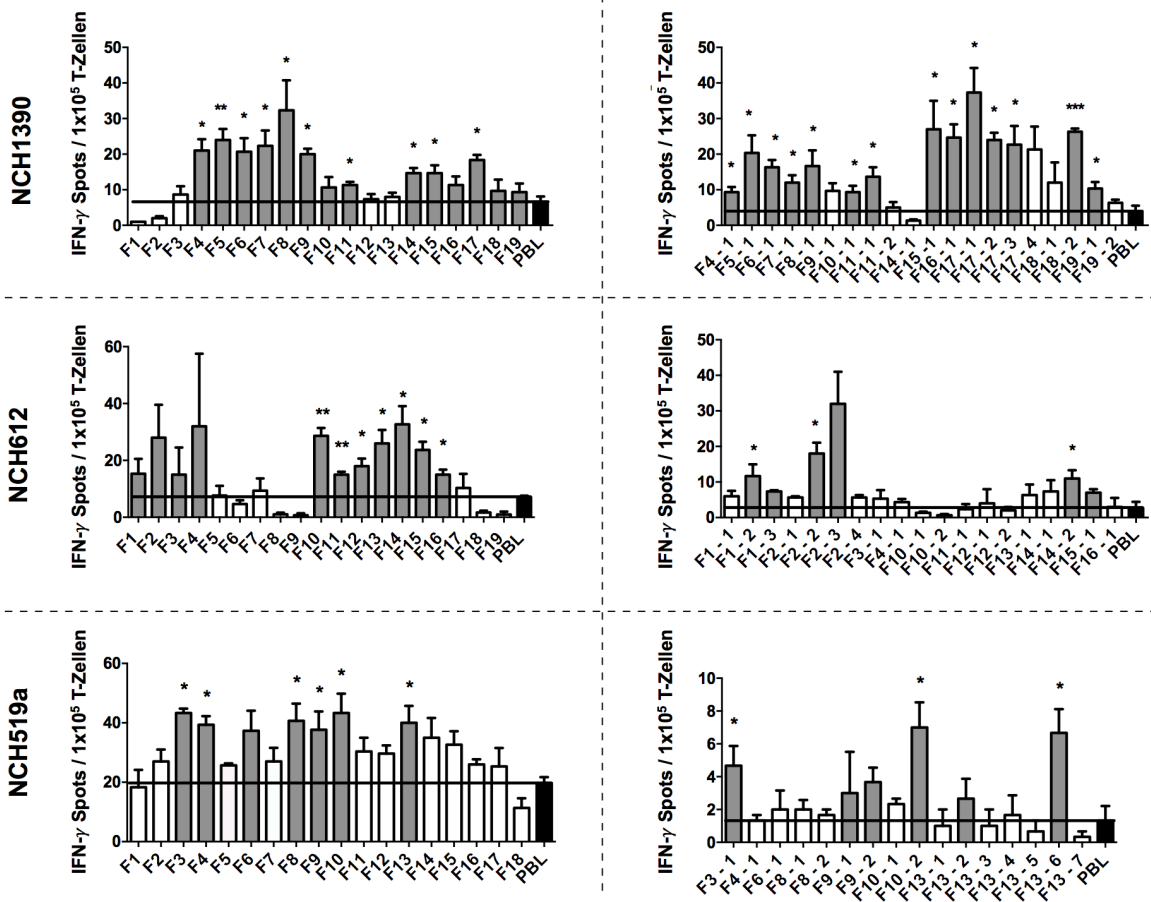


Abbildung 33: Nachweis spontaner T-Zell-vermittelter Immunantworten mittels IFN- γ ELISpots der Patienten NCH1390, NCH612 und NCH519a gegen Tumorlysatfraktionen (F der **A** ersten (1D) und **B** zweiten (2D) PF2D-Dimension). Die Balkendiagramme stellen jeweils den Mittelwert \pm SEM dar. (PBL, *Peripheral Blood Lymphocytes*; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$)

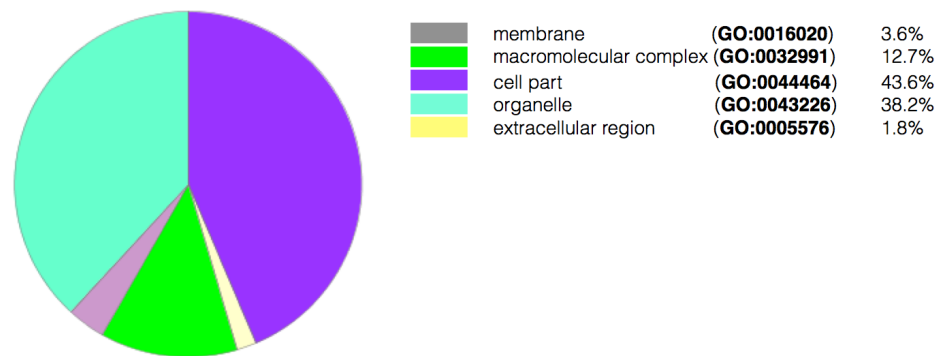


Abbildung 34: Zellkompartiment-spezifische Zuordnung der massenspektrometrisch identifizierten Proteine (*Gene Ontology Term Enrichment Analysis*).

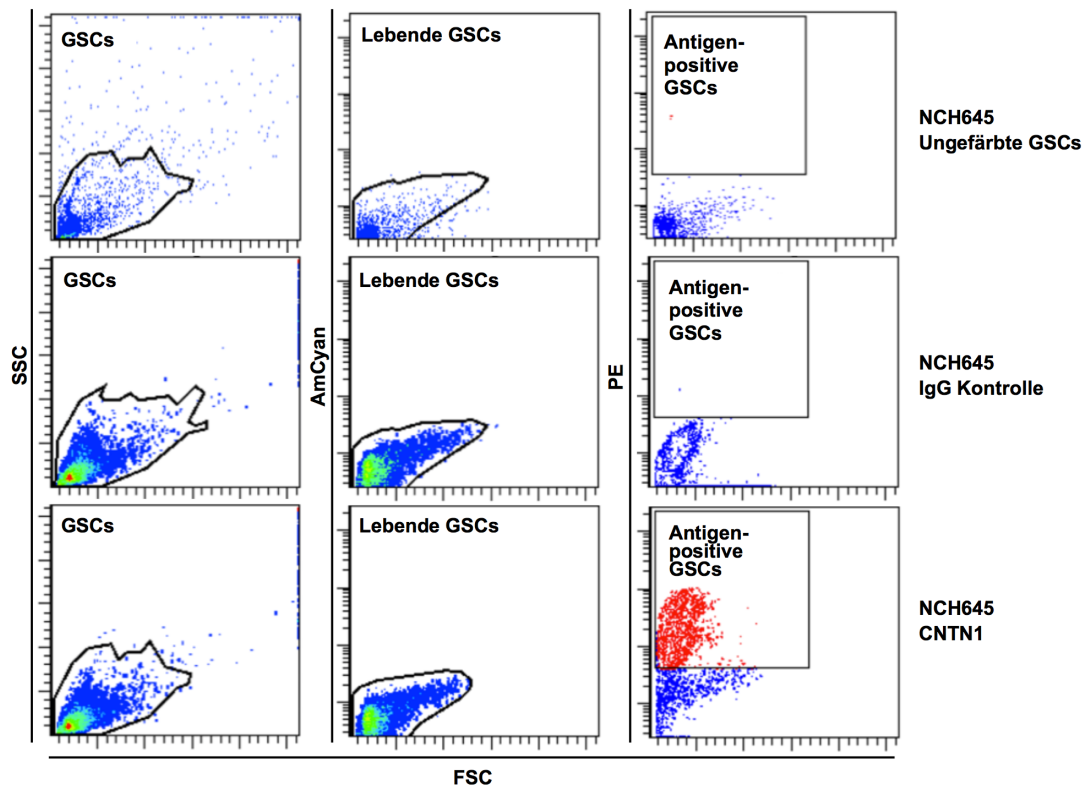


Abbildung 35: Repräsentative Darstellung (NCH645) der Gatingstrategie zur Bestimmung der Antigenexpression auf Stammzell-ähnlichen Gliomzellen (*Gliom-Stem-like Cells*, GSCs). Von links nach rechts: GSC-Population, lebende GSCs und Antigen-positive GSCs. (SSC, *Sideways Scatter*; FSC, *Forward Scatter*)

Tabelle 35: Funktionelle Annotation der massenspektrometrisch-identifizierten potentiellen TAA-Kandidaten mittels *SP-PIR-KEYWORDS* (<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>)

Bezeichnung	Anzahl	[%]	p-Wert	Benjamini
<i>acetylation</i>	47	64,4	8,8E-23	1,8E-20
<i>cytoplasm</i>	42	57,5	3,8E-14	3,9E-12
<i>phosphoprotein</i>	53	72,6	2,9E-9	2,0E-7
<i>acetylated amino end</i>	7	9,6	2,0E-6	1,0E-4
<i>actin binding</i>	5	6,8	1,5E-5	6,2E-4
<i>cytoskeleton</i>	11	15,1	1,2E-4	4,3E-3
<i>antioxidant</i>	3	4,1	4,9E-4	1,4E-2
<i>cell projection</i>	6	8,2	1,0E-3	2,7E-2
<i>inflammation</i>	3	4,1	3,9E-3	8,7E-2
<i>blocked amino end</i>	4	5,5	5,0E-3	9,9E-2
<i>calcium binding</i>	4	5,5	6,8E-3	1,2E-1
<i>lyase</i>	4	5,5	9,9E-3	1,6E-1
<i>metalloprotein</i>	4	5,5	1,1E-2	1,7E-1
<i>actin-binding</i>	5	6,8	1,4E-2	1,9E-1
<i>tumor suppressor</i>	4	5,5	1,5E-2	1,9E-1
<i>cysteine proteinase inhibitor</i>	2	2,7	3,0E-2	3,2E-1
<i>hyaluronic acid</i>	2	2,7	3,7E-2	3,7E-1
<i>endonexin fold</i>	2	2,7	4,0E-2	3,8E-1
<i>secreted</i>	12	16,4	4,9E-2	4,2E-1
<i>annexin</i>	2	2,7	5,1E-2	4,2E-1
<i>calcium/phospholipid-binding</i>	2	2,7	5,5E-2	4,3E-1
<i>oxidation</i>	2	2,7	5,5E-2	4,3E-1
<i>protease inhibitor</i>	3	4,1	6,1E-2	4,5E-1
<i>extracellular matrix</i>	4	5,5	6,2E-2	4,4E-1
<i>hydro-lyase</i>	2	2,7	6,2E-2	4,2E-1
<i>disease mutation</i>	11	15,1	7,2E-2	4,6E-1
<i>carbon-oxygen lyase</i>	2	2,7	7,2E-2	4,5E-1
<i>phospholipid binding</i>	2	2,7	7,9E-2	4,7E-1
<i>calcium</i>	7	9,6	8,0E-2	4,6E-1
<i>gpi-anchor</i>	3	4,1	8,1E-2	4,5E-1
<i>peroxidase</i>	2	2,7	9,0E-2	4,8E-1
<i>host-virus interaction</i>	4	5,5	9,1E-2	4,7E-1
<i>cell cycle</i>	5	6,8	9,4E-2	4,7E-1

Tabelle 36: GOTERM-Analyse der massenspektrometrisch-identifizierten potentiellen TAA-Kandidaten mittels GOTERM-BP-FAT (<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>)

Bezeichnung	Anzahl	[%]	p-Wert	Benjamini
<i>anti-apoptosis</i>	9	12,3	5,4E-6	4,8E-3
<i>regulation of apoptosis</i>	15	20,5	1,8E-5	8,1E-3
<i>regulation of programmed cell death</i>	15	20,5	2,0E-5	6,0E-3
<i>regulation of cell death</i>	15	20,5	2,1E-5	4,7E-3
<i>negative regulation of apoptosis</i>	10	13,7	4,0E-5	7,2E-3
<i>negative regulation of programmed cell death</i>	10	13,7	4,5E-5	6,7E-3
<i>negative regulation of cell death</i>	10	13,7	4,6E-5	5,9E-3
<i>cell motion</i>	11	15,1	7,2E-5	8,0E-3
<i>cytoskeleton organization</i>	10	13,7	2,0E-4	2,0E-2
<i>Ras protein signal transduction</i>	5	6,8	1,5E-3	1,3E-1
<i>response to hydrogen peroxide</i>	4	5,5	2,3E-3	1,7E-1
<i>response to heat</i>	4	5,5	2,3E-3	1,7E-1
<i>reactive oxygen species metabolic process</i>	4	5,5	3,9E-3	2,5E-1
<i>actin cytoskeleton organization</i>	6	8,2	4,3E-3	2,6E-1
<i>intermediate filament-based process</i>	3	4,1	4,8E-3	2,6E-1
<i>response to reactive oxygen species</i>	4	5,5	5,4E-3	2,7E-1
<i>actin filament-based process</i>	6	8,2	5,6E-3	2,7E-1
<i>hydrogen peroxide metabolic process</i>	3	4,1	6,2E-3	2,8E-1
<i>response to organic substance</i>	10	13,7	6,5E-3	2,8E-1
<i>response to temperature stimulus</i>	4	5,5	7,1E-3	2,9E-1
<i>response to wounding</i>	8	11,0	1,2E-2	4,3E-1
<i>aging</i>	4	5,5	1,5E-2	4,8E-1
<i>response to inorganic substance</i>	5	6,8	1,6E-2	4,8E-1
<i>cell adhesion</i>	9	12,3	1,7E-2	4,9E-1
<i>biological adhesion</i>	9	12,3	1,7E-2	4,7E-1
<i>response to drug</i>	5	6,8	1,9E-2	5,0E-1
<i>membrane to membrane docking</i>	2	2,7	2,3E-2	5,6E-1
<i>negative reg. of cellular component organization</i>	4	5,5	3,0E-2	6,3E-1
<i>removal of superoxide radicals</i>	2	2,7	3,3E-2	6,6E-1
<i>glucose metabolic process</i>	4	5,5	3,6E-2	6,8E-1
<i>natural killer cell mediated immunity</i>	2	2,7	3,7E-2	6,8E-1
<i>natural killer cell mediated cytotoxicity</i>	2	2,7	3,7E-2	6,8E-1
<i>neurofilament cytoskeleton organization</i>	2	2,7	3,7E-2	6,8E-1
<i>response to oxidative stress</i>	4	5,5	4,3E-2	7,2E-1
<i>actin filament organization</i>	3	4,1	4,6E-2	7,3E-1
<i>response to superoxide</i>	2	2,7	4,6E-2	7,2E-1
<i>leukocyte mediated cytotoxicity</i>	2	2,7	4,6E-2	7,2E-1
<i>response to oxygen radical</i>	2	2,7	5,1E-2	7,5E-1
<i>small GTPase mediated signal transduction</i>	5	6,8	5,6E-2	7,7E-1
<i>MAPK cascade</i>	4	5,5	5,6E-2	7,7E-1
<i>hexose metabolic process</i>	4	5,5	6,3E-2	7,9E-1
<i>defense response</i>	7	9,6	7,0E-2	8,2E-1
<i>cell cycle</i>	8	11,0	7,3E-2	8,2E-1
<i>homeostasis of number of cells</i>	3	4,1	8,1E-2	8,5E-1
<i>negative regulation of cell differentiation</i>	4	5,5	8,2E-2	8,5E-1

Tabelle 37: Auflistung alternativer HLA-A- und -B-Allele, welche die *in silico*-bestimmten HLA-A*02-restringierten Epitope ebenfalls mit einem IC₅₀ < 500 nM binden können

Antigen	Länge [AS]	Position [AS]	Alternative Allele (IC ₅₀ < 500 nM)
RE1 CFL1	8	97-104	A*02:01, A*02:09
RE2 CFL1	9	97-105	A*02:01, A*02:09, A*68:02
RE3 CFL1	9	79-87	A*02:01, A*02:09
RE4 CNTN1	8	633-640	B*08:01, B*07:02, B*53:01
RE5 CNTN1	8	620-627	A*68:01, A*31:01
RE6 CNTN1	9	643-650	A*30:01
RE7 CRKII	10	234-243	A*02:01, A*02:09
RE8 CRKII	10	256-265	A*02:01, A*02:09
RE9 CRKII	9	233-241	A*02:01, A*02:09
RE10 CRKII	9	256-264	A*02:01, A*02:09
RE11 NME2	10	68-77	A*02:01, A*29:02, A*02:09, B*15:01, B*39:01
RE12 NME2	10	76-85	A*02:01, A*02:09
RE13 NME2	8	68-75	A*02:01, A*02:09, B*15:01
RE14 NME2	9	68-76	A*02:01, A*02:09, B*15:01
RE15 NME2	9	77-85	A*02:01, A*02:09, A*68:02
RE16 TKT	10	92-99	A*02:01, A*02:09
RE17 TKT	10	73-82	A*02:01, A*02:09

Abkürzungen: AS, Aminosäure

Tabelle 38: Quantifizierung Antigen-spezifischer zytotoxischer PBMTs mittels Durchflusszytometrie mit den Antigenen (CRKII, NME2, TKT) und der entsprechenden Positivkontrolle (PK, Influenza M1) bzw. Negativkontrolle (NK)

Patient	Tetramer	Events	CD3 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	abs. CD3 ⁺ CD8 ⁺ TET ⁺	rel. CD3 ⁺ CD8 ⁺ TET ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺ TET ⁺ (aus CD3 ⁺ CD8 ⁺) [%]	CD3 ⁺ CD8 ⁺ TET ⁺ (aus CD3 ⁺) [%]
NCH1000	PK	11.320	359	73	0	N.A.	N.A.	N.A.
NCH1000	NK	4.994	230	77	0	0	0,00	0,00
NCH1000	CRKII	19.076	601	146	3	3	2,05	0,50
NCH1000	NME2	72.360	2.213	464	1	0	0,00	0,00
NCH1000	TKT	6.689	278	71	2	1	1,41	0,36
NCH1150	PK	28.070	9.670	3.653	3	N.A.	N.A.	N.A.
NCH1150	NK	70.800	24.120	8.676	38	35	0,40	0,15
NCH1150	CRKII	101.040	75.337	12.083	45	42	0,35	0,06
NCH1150	NME2	138.864	46.187	16.387	47	44	0,27	0,10
NCH1150	TKT	139.906	46.122	16.256	64	61	0,38	0,13
NCH1152	PK	27.759	11.497	4.130	22	N.A.	N.A.	N.A.
NCH1152	NK	68.251	29.039	10.845	98	76	0,70	0,26
NCH1152	CRKII	143.869	62.881	24.021	235	213	0,89	0,34
NCH1152	NME2	138.947	57.758	21.189	112	90	0,42	0,16
NCH1152	TKT	139.309	57.362	21.390	129	107	0,50	0,19
NCH1390	PK	11.505	496	287	0	N.A.	N.A.	N.A.
NCH1390	NK	2.953	153	83	1	1	1,20	0,65
NCH1390	CRKII	1.611	57	28	0	0	0,00	0,00
NCH1390	NME2	17.332	834	487	0	0	0,00	0,00
NCH1390	TKT	14.473	329	124	0	0	0,00	0,00
NCH2111	PK	30.672	9.187	2.959	5	N.A.	N.A.	N.A.
NCH2111	NK	79.704	21.497	6.705	69	64	0,95	0,30
NCH2111	CRKII	77.158	21.615	6.293	46	41	0,65	0,19
NCH2111	NME2	157.416	42.059	12.301	74	69	0,56	0,16
NCH2111	TKT	144.592	44.028	12.985	93	88	0,68	0,20
NCH3855	PK	27.330	11.399	4.003	2	N.A.	N.A.	N.A.
NCH3855	NK	70.625	28.276	9.236	45	43	0,47	0,15
NCH3855	CRKII	140.317	58.389	20.627	95	93	0,45	0,16
NCH3855	NME2	141.816	57.684	19.225	49	47	0,24	0,08
NCH3855	TKT	141.263	57.312	19.517	42	40	0,20	0,07

7 Eigene Publikationen

Rathinasamy A., Domschke C., Ge Y., Böhm HH., **Dettling S.**, Jansen D., Lasitschka F., Umansky L., Gräler M.H., Hartmann J., Herold-Mende C., Schuetz F., Beckhove P., *Tumor specific regulatory T cells in the bone marrow of breast cancer patients selectively upregulate the emigration receptor S1P1.* *Cancer Immunol Immunother* (2017). doi:10.1007/s00262-017-1964-4

Rapp C., Warta R., Stamova S., Nowrouzi A., Geisenberger C., Gal Z, Roesch S., **Dettling S.**, Juenger S., Bucur M., Jungk C., DaoTrong P., Ahmadi R., Sahm F., Reuss D., Fermi V., Herpel E., Eckstein V., Grabe N., Schramm C., Weigand MA., Debus J., von Deimling A., Unterberg A., Abdollahi A., Beckhove P., Herold-Mende C., *Identification of T cell target antigens in glioblastoma stem-like cells using an integrated proteomics-based approach in patient specimens.* *Acta Neuropathol.* (2017). doi: 10.1007/s00401-017-1702-1

Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die mich in den letzten Jahren unterstützt und somit zum Gelingen meiner Promotion beigetragen haben.

Vorrangig möchte ich mich bei *Prof. Dr. Christel Herold-Mende* bedanken, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte und mir durch ihre exzellente Betreuung immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für dein mir entgegengebrachtes Vertrauen, dein Verständnis und deine umfangreiche Unterstützung.

Für die externe Betreuung meiner Promotion im Rahmen des DKFZ PhD Programmes geht mein herzlicher Dank an *Prof. Dr. Philipp Beckhove* und *Prof. Dr. Viktor Umansky*.

Da dieses Projekt nicht ohne eine enge Zusammenarbeit mit der Neurochirurgie der Universitätsklinik Heidelberg möglich gewesen wäre, geht mein Dank auch an *Prof. Dr. Andreas Unterberg* und seine Mitarbeiter. Im Besonderen an *Dr. Christin Jungk*, *Dr. Benito Campos*, *Dr. Philip Dao Trong* und *Dr. Frederik Enders*, die mir bei allen klinischen Belangen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Des Weiteren gilt mein Dank den Kooperationspartnern *Dr. Volker Eckstein* für die Durchführung von FACS-Analysen sowie *Dr. Martina Schnölzer* für die Durchführung von massenspektrometrischen Untersuchungen.

Mein besonderer Dank geht auch an *Dr. Slava Stamova*, die mit konstruktiver Kritik und tatkräftiger Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Des Weiteren möchte ich mich auch bei *Dr. Anchana Rathinasamy* und *Chieh-Yeh Pystal Chen* sowie allen anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Beckhove bedanken, die mich unkompliziert und ausgesprochen hilfsbereit in ihre Arbeitsgruppe integriert haben.

Ein besonders herzlicher Dank geht natürlich an alle aktuellen und ehemaligen Mitarbeiter meiner Arbeitsgruppe für die stets kollegiale Atmosphäre sowie die schönen, lustigen, leckeren und vinophilen Momente im Labor.

Vielen Dank *Dr. Rolf Warta* für die anregenden und konstruktiven Diskussionen sowie deine vielfältige Unterstützung in jeglichen Belangen.

Ein besonders großer und herzlicher Dank geht im Speziellen an meine beiden Mitdotorandinnen.

Vielen Dank *Dr. Saskia Rösch* für eine äußerst gute und produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit. Insbesondere bei *Dr. Carmen Rapp* möchte ich mich für die einzigartige Zeit im Büro aber auch für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor bedanken. Unsere zahlreichen Gespräche auf wissenschaftlicher und persönlicher Ebene, deine zuverlässige Art sowie dein akribisches „Adlerauge“ waren mir immer eine sehr große Hilfe.

Auch möchte ich mich bei *Andreas Mock*, *Christoph Geisenberger* und *Kolja Pocha* bedanken, die mir eine große Hilfe bei bioinformatischen Problemen waren. Ein zusätzlicher Dank geht an *Kolja Pocha* und *Jan Mosseman* für eine lebhafte Zeit innerhalb und außerhalb der Kopfklinik. Ich bedanke mich auch bei meinen Studenten *Laura Hartmann*, *Anastasia Makarevic*, *Lisa Ruff* und *Tabea Stephan* für die tatkräftige Unterstützung bei verschiedenen Projekten.

Letztlich geht ein besonders großer Dank an die technischen Assistenten und Mitarbeiter der AG Herold-Mende *Melanie Greibich*, *Farzaneh Kashfi*, *Ilka Hearn*, *Hilde Göltzer*, *Axel Schöffel* und *Cinja Sackmann* sowie *Mandy Barthel*, *Anja Metzner* und *Daniela Zito* für die hervorragende Unterstützung. Auch den technischen Assistenten *Simone Jünger*, *Mariana Buccur* und *Ludmila Umansky* aus der AG Beckhove gilt ein besonderer Dank für die gute Zusammenarbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich außerdem bei *Sabine Kern*, *Alexandra Schlotthauer*, *Melanie Stöck* und *Dirk Szesniak* für ihre Hilfsbereitschaft und sorgfältige Durchsicht meiner Arbeit. „Gute Freunde erkennt man leichter, wenn das Leben schwerer wird“- daher möchte ich mich besonders bei *Dirk* und *Sabine* bedanken. Da ihr immer für mich da seid, habt auch ihr wesentlich zum Gelingen meiner Promotion beigetragen.

Meinen Eltern *Karin* und *Bruno* möchte ich für so vieles danken. Durch euer Vertrauen und eure uneingeschränkte Unterstützung hatte ich stets die Sicherheit und Zuversicht, meine eigenen Wege zu gehen und meine Ziele zu verwirklichen.

Abschließend möchte ich mich von Herzen bei meiner Frau *Sarah* bedanken, ohne die ich weder den praktischen noch den schriftlichen Teil dieser Dissertation je zu Ende hätte bringen können. Vielen Dank für deinen bedingungslosen Rückhalt, deine motivierende Art, deine unendliche Geduld und deine Liebe, mit der du mir immer wieder zeigst, was wirklich wichtig ist.